



# Développement d'un nouveau système hybride de traduction in vitro et étude du rôle traductionnel de la protéine NS1 de l'Influenza A

Baptiste Panthu

## ► To cite this version:

Baptiste Panthu. Développement d'un nouveau système hybride de traduction in vitro et étude du rôle traductionnel de la protéine NS1 de l'Influenza A. Virologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10131 . tel-01150577

**HAL Id: tel-01150577**

**<https://theses.hal.science/tel-01150577>**

Submitted on 11 May 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre

Année 2013

**THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON**

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE BMIC

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 5 Septembre 2013

par Monsieur Baptiste PANTHU

---

**TITRE :**

**Développement d'un nouveau système hybride de traduction *in vitro*  
et étude du rôle traductionnel de la protéine NS1 de l'Influenza A**

---

Directeur de thèse : Théophile OHLMANN

**JURY :**

Professeur Patrice ANDRE, Président du jury

Docteur Daniel MARC, Membre

Professeur Marcello LOPEZ-LASTRA, Membre rapporteur

Docteur Théophile OHLMANN, Membre

Docteur Manuel ROSA-CALATRAVA, Membre

Docteur Bruno SARGUEIL, Membre rapporteur



## Remerciements

Je voudrais remercier le Professeur Lopez-Lastra et le Docteur Sargueil, membres rapporteurs, pour avoir évalué ce travail qui représente pour moi quatre années d'un travail des plus stimulant et intéressant. Je tiens à remercier le Professeur André qui a accepté de présider mon jury de thèse et enfin merci au Docteur Ohlmann d'être membre examinateur de mon jury.

Merci aux Docteurs Ohlmann, Décimo et Balvay pour m'avoir accueilli dans l'équipe de recherche et pour m'avoir formé aux techniques de biologie cellulaire et moléculaire. Votre soutien du début à la fin m'a beaucoup marqué et je vous suis très reconnaissant pour les savoirs que vous m'avez transmis. Théo, merci pour tous tes conseils, ton soutien et ton optimisme sans faille. Didier, les idées (et astuces) qui fourmillent dans ta tête et que tu n'hésites pas à partager m'ont permis d'apercevoir le champ d'expériences qu'il reste à réaliser et à imaginer. Laurent, ta rigueur et ton recul scientifiques m'impressionnent toujours et j'en retiens les subtilités de la communication scientifique en sachant que j'ai encore du travail à fournir.

Merci également à tous les membres du labo passés et actuels, Sylvain, Christelle, Ricardo, Taran, Paulina, Chloé, Clément, Audrey, Delphine, Adeline, Gaël, Maxence, pour leur sympathie, leur humour sans oublier les footings hebdomadaires avec Sylvain pour s'aérer les neurones.

Merci à l'équipe Virpath et surtout aux Docteurs Rosa-Calatrava et Carron pour leur sympathie et de m'avoir permis de travailler avec des cellules infectées. Manu et Coco, grâce à vous, j'ai pu approcher le virus dans toute sa fourberie.

Merci aux Docteurs Cimorelli et Chavatte, membres de mon comité de suivi de thèse, qui m'ont bien conseillé en pointant les contrôles manquant lors de mon étude et en me suggérant des expériences complémentaires qui ont fait la plus-value de ce travail.

Un clin d'œil à toutes les personnes du CIRI, du LBMC, de la tour CERVI, de l'IBCP et de l'UCBL1 avec qui j'ai pu échanger voire manipuler. Merci en particulier à Fabrice, j'ai particulièrement apprécié de travailler avec toi. Merci à Thibaut, tu es un représentant des doctorants top sur qui j'ai pu compter.

Je remercie la force de capillarité qui m'a bien soutenue dans quelques situations maladroites.

Enfin, un grand merci Alice pour ton soutien pendant ces années et surtout pendant la dernière ligne droite et gros bisous à mon petit Matias qui a pris un rythme nocturne optimal pendant la rédaction de ce manuscrit.

## Liste des abréviations :

5'UTR	Région 5' non traduite (UnTranslated region)
4EBP	Protéine de liaison à eIF4E (4E Binding Protein)
A, U, G, C	Bases nucléotidiques
A-box	Domaine ARN de liaison de la protéine GRSF1
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
AEV	Avian Encephalomyelitis Virus
ARN	Acide RiboNucléique
ARNc	ARN complémentaire
ARNm	ARN messenger
ARNr	Arn ribosomal
ARNt	ARN de transfert
ARNv	ARN viral
ATP	Adénosine TriPhosphate
c-myc	Proto-oncogène cellulaire Myc
CAT	Chloramphénicol Acétyl Transférase
A549	Lignée de cellules épithéliales pulmonaires
COS-1	Lignée de cellules issues de fibroblastes de reins de singe
CPSF30	Facteur de clivage polyadénylation spécifique (Cleavage and Polyadenylation Specific Factor 30)
CRM1	Exportine 1 (Chromosomal Maintenance 1)
CrPV	Cricket Paralysis Virus
CTD	Domaine carboxyterminal de la Rna polymérase II (Carboxy Terminal Domain)
DDT	Antioxydant (DL-DithioThreitol)
DDX3	Protéine à domaine DEAD (DeaD boX 3)
EBERs	Petits ARNs codés par EBV (EBV Encoded small RNAs)
EBV	Epstein-Barr Virus
eEF	Facteur d'élongation eucaryote (eucaryotic Elongation Factor)
EGTA	Agent chélateur d'ions calcium (Ethylene Glycol Tetraacetic Acid)
eIF	Facteur d'initiation eucaryote (eukaryotic Initiation Factor)
EMCV	EncephaloMyocarditis Virus
eRF	Facteur de relargage eucaryote (eukaryotic Relaeasing Factor)
FMDV	Foot and Mouth Disease Virus
G6P	Glyceraldehyde 6-Phosphate
GCN2	Kinase de eIF2 $\alpha$ (General Control Nonrepressed 2)
GFP	Protéine qui fluoresce dans le vert (Green Fluorescent Protein)
GpppG	Analogue de la coiffe
GROG	Groupes Régionaux d'Observation de la Grippe

GRSF1	Facteur riche en guanine (Guanine Rich Sequence Factor 1)
GTP	Guanosine TriPhosphate
HA	Héماغglutinine
HA <sub>0</sub>	Précurseur de l'Héماغglutinine
HCV	Hepatitis C virus
HIV	Human Immunodeficiency virus
HRI	Kinase de eIF2 $\alpha$ (Heme Regulated Inhibitor)
HSP70	Protéine chaperone (Heat Shock Protein 70)
INSERM	Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale
IRES	Séquence d'entrée interne des ribosomes (Internal Ribosome Entry Site)
ITAF	Facteur agissant en trans des IRES (IRES Trans Acting Factor)
KCl	Chlorure de potassium
M1	Protéine de matrice 1
M2	Protéine de matrice 2
MFC	Complexe multifactoriel (MultiFactor Complex)
miARN	Micro ARN
Mnk1	Kinase de eIF4E (MAP kinase signal-integrating kinase 1)
mTOR	Cible de la rapamycine chez les Mammifères (mammalian Target Of Rapaycin)
NA	Neuraminidase
NANA	Acide N-acétylneuraminique
NEP	Protéine d'export nucléaire (Nuclear Export Protein)
NF $\kappa$ B	Facteur de transcription (Nuclear-Factor kappa B)
NS1	Protéine non structurale 1 (NonStructural protein 1)
OAS	OligoAdenylate Synthetase
ORF	Cadre ouvert de lecture (Open Reading Frame)
PA	Protéine acide
PABP	Protéine de liaison à la queue poly(A) des ARNm (Poly(A) Binding Protein)
PAIP1	Protéine d'interaction à la PABP (PABP Interacting Protein 1)
PAP	Poly(A) polymérase
PB1	Protéine Basique 1
PB1-F2	Fragment 2 de le Protéine Basique 1
PB2	Protéine Basique 2
PEP	PhosphoEnolPyruvate
PERK	Kinase de eIF2 $\alpha$ (Protein kinase RNA like Endoplasmic Reticulum Kinase)
Pi	Phosphate inorganique
PI3 Kinase	Kinase de la voie AKt (phosphatidyl-inositol 3-kinase)
PIC	Complexe de préinitiation (PreInitiation Complex)
PISA	Protein In Situ Array
PKR	Protéine Kinase ARN dépendante

PR8	Souche Influenza A/Puerto Rico/8/1934(H1N1)
p2A	Protéase 2A du poliovirus
p3C	Protéase 3C des rhinovirus
pL	Protéase L du FMDV
PTB	Polypyrimidine Tract Binding protein
PV	Poliovirus
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
REG	Réticulum Endoplasmique Granuleux
RIG-I	Helicase ARN impliquée dans la réponse antivirale (Retinoic acid inducible gene)
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RNPm	RiboNucléoProtéine messenger
RNPv	RiboNucléoProtéine virale
RPL	Protéine de la grosse sous-unité ribosomale
RPS	Protéine de la petite sous-unité ribosomale
RRL	Lysat de réticulocyte de lapin (Rabbit Reticulocyte Lysate)
S30	Fraction cytoplasmique bactérienne débarrassée de son information génétique
SEAP	Gène rapporteur (Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase)
TC	Complexe ternaire (Ternary Complex)
TGF- $\beta$	Facteur de transcription (Tumor Growth Factor $\beta$ )
UNI12	Séquence en 3' de l'ARNv de l'Influenza A très conservée
UNI13	Séquence en 5' de l'ARNv de l'Influenza A très conservée
uORF	ORF en amont (upstream ORF)
uRRL	RRL non traité à la nucléase S7 (untreated RRL)
UTR	Région non traduite (UnTranslated Region)
UV	Ultraviolets
VLP	Virus Like Particle
WGE	Extraits de germes de blé (Wheat Germ Extract)
WSN	Souche Influenza A/WSN/1940(H1N1)

## Table des matières

Liste des abréviations : .....	4
--------------------------------	---

---

### PARTIE I : INTRODUCTION

---

.....	16
-------	----

Chapitre I : La traduction eucaryote .....	19
--	----

1 Généralités .....	19
---------------------	----

1.1 Place de la traduction dans le cycle cellulaire .....	19
---	----

1.2 Structure de l'ARNm eucaryote nécessaire pour la traduction.....	21
--	----

2 Présentation globale de la traduction eucaryote .....	23
---	----

3 L'initiation de la traduction : étape finement régulée .....	25
--	----

3.1 La formation du complexe ternaire puis du 43S .....	27
---	----

3.2 Assemblage du complexe de préinitiation (PIC) sur l'ARNm .....	29
--	----

3.3 Le balayage de la petite sous-unité ribosomale jusqu'au codon initiateur .....	29
--	----

3.4 Le recyclage des ribosomes.....	31
-------------------------------------	----

4 Les acteurs de l'initiation de la traduction .....	33
--	----

4.1 Recrutement du ribosome et contexte nucléotidique autour de l'AUG .....	33
---	----

4.2 Le complexe eIF4F, indispensable à toute initiation coiffe dépendante de la traduction .....	35
---	----

4.2.1 eIF4E, la tour de contrôle .....	37
--	----

4.2.2 eIF4A prépare la plateforme pour l'arrimage.....	39
--	----

4.2.3 eIF4G, l'enrôleur.....	41
------------------------------	----

4.3 La queue poly(A) et PABP .....	43
4.4 eIF4B, un complément indispensable .....	45
4.5 Le complexe eIF3, l'étoile versatile .....	47
4.6 La sous-unité ribosomale 40S et les eIF associés, la diva .....	49
<b>5 Eléments régulateurs de la traduction .....</b>	<b>49</b>
5.1 Régulation en <i>trans</i> .....	51
5.1.1 Les kinases d'eIF2 $\alpha$ .....	51
5.1.2 La régulation de l'activité de eIF4E .....	53
5.1.3 Autres facteurs stimulateurs de la traduction .....	55
5.1.4 Le ribosome spécialisé .....	57
5.1.5 Des protéases virales : cliver pour mieux régner .....	59
5.2 Régulation en <i>cis</i> .....	61
5.2.1 Les IRES .....	61
5.2.2 Régulation de l'activité IRES .....	63
<b>Chapitre II : les virus de l'Influenza A responsables de la grippe</b>	
.....	67
<b>1 Généralités .....</b>	<b>67</b>
1.1 Historique et étymologie du virus .....	67
1.2 Etiologie de la grippe .....	69
1.3 Classification et nomenclature .....	71
1.4 Des virus redoutables .....	73
1.5 ...et redoutés .....	75
1.6 Un vaccin, des vaccins .....	75
1.6.1 Pourquoi renouveler le vaccin annuellement ? .....	75

1.6.2 Production des vaccins.....	79
1.7 Les réseaux de surveillance de la grippe .....	81
<b>2 Organisation de la particule virale .....</b>	<b>83</b>
2.1 Génome viral .....	83
2.2 Les protéines structurales .....	85
2.3 Les protéines non structurales .....	87
<b>3 Bref aperçu du cycle viral .....</b>	<b>87</b>
3.1 Reconnaissance des récepteurs cibles et entrée du virus.....	89
3.2 Transcription et réplication du génome .....	89
3.3 Synthèse et acheminement des protéines virales .....	93
3.4 Export, transport, emballage des RNPvs et bourgeonnement viral .....	95
<b>4 La réponse cellulaire et Shut off.....</b>	<b>97</b>
4.1 La réponse antivirale cellulaire.....	97
4.2 La stratégie de l'Influenza A.....	99
4.3 L'entrée en apoptose viro-induite .....	99
<b>5 Précisions sur les UTR virales.....</b>	<b>103</b>
5.1 Organisation des UTR virales .....	103
5.2 Les multiples fonctions des 5'UTR .....	105
<b>6 Précisions sur la protéine virale NS1 : une protéine multifonctionnelle.....</b>	<b>107</b>
6.1 Structure de la protéine et ses interactants cellulaires.....	107
6.2 Les multiples fonctions de NS1 .....	109
<b>7 Influenza et traduction .....</b>	<b>111</b>



7.1 Les premières approches par co-infection.....	111
7.2 Place des 5'UTR dans la traduction virale.....	113
7.2.1 Contexte Kozak des 5'UTR .....	115
7.2.2 Les 5'UTR virales en contexte infectieux .....	115
7.3 Rôle des facteurs <i>trans</i> .....	117
7.3.1 Les facteurs canoniques et l'initiation de la traduction pour l'Influenza A .....	117
7.3.2 Intervention du facteur cellulaire GRSF1 .....	119
7.3.3 La protéine PB2 : de la reconnaissance de la coiffe à la substitution de eIF4E ?	121
7.3.4 La protéine NS1 : une fonction importante dans la traduction .....	123
<b>Chapitre III: Les systèmes <i>in vitro</i> .....</b>	<b>127</b>
<b>1 Principe des systèmes acellulaires .....</b>	<b>127</b>
1.1 Historique et généralités .....	127
1.2 Concept et intérêt de ces systèmes .....	129
1.3 Les différents systèmes .....	133
<b>2 Les différents lysats cellulaires et leurs limites.....</b>	<b>135</b>
2.1 Le lysat d' <i>Escherichia coli</i> .....	137
2.2 Les extraits de germe de blé .....	139
2.3 Le lysat de réticulocyte de lapin .....	141
2.4 Le lysat de cellules HeLa .....	143
2.5 Les lysats non commercialisés.....	145
<b>3 Un outil de recherche et de développement technologique</b>	<b>147</b>
3.1 Des découvertes historiques .....	147
3.2 Utilisation en recherche fondamentale .....	147
3.2.1 Avancées scientifiques qui s'appuient sur le RRL.....	147

3.2.2 Des outils de biotechnologie adaptés au RRL .....	149
3.3 Production de protéines.....	151
3.3.1...rapidement.....	153
3.3.2... marquées.....	153
3.3.3...toxiques en cellules.....	155
3.3.4... d'intérêt médical.....	155
3.4 Des systèmes qui peuvent être associés à des technologies de haut débit.....	157
4 Limites des systèmes <i>in vitro</i> et les réponses associées ....	157

---

## PARTIE II : RESULTATS

---

.....	162
Introduction au travail expérimental .....	163
1. Article 1 .....	165
2. Article 2 .....	222
3. Annexe 1 : Exemple d'utilisation du système hybride pour des systèmes viraux complexes : Analyse de la coiffe dépendance des ARNm du virus de l'Influenza A.....	253
.....	256

---

## PARTIE III : DISCUSSION et PERSPECTIVES

---

.....	258
Chapitre I: Des systèmes <i>in vitro</i> pour étudier la traduction chez les Mammifères .....	259
1 Des systèmes indispensables .....	259
2 Les limites des lysats « classiques » .....	259
3 Les limites et perspectives du système hybride .....	261
3.1 Faiblesses et flexibilités du système hybride .....	261
3.2 Des perspectives pour des techniques de haut débit .....	262
Chapitre II : Influenza A et traduction .....	264
1 Stimulation de la traduction en contexte infectieux .....	264
1.1 Révision et approfondissement des données antérieures .....	264
1.2 La stratégie de l'Influenza A, une stratégie pertinente .....	265
1.3 Une stratégie qui se retrouve chez d'autres virus .....	266
2 Applications antivirales et technologiques .....	266
2.1 Place de la protéine NS1 dans la lutte antivirale .....	266
2.2 Un complément pour les systèmes de production de protéines .....	267

---

## BIBLIOGRAPHIE

---

.....	268
1 Ouvrages .....	269
2 Articles de périodiques.....	270

---

## RESUMES

---

.....	286
-------	-----

## TABLE DES FIGURES

Figure 1 : <i>Place de la traduction dans la cellule</i> .....	18
Figure 2: <i>Polyadénylation de l'ARNpré-messager et organisation de l'ARNmessenger</i> .....	20
Figure 3: <i>Les trois étapes de la traduction et coût énergétique</i> .....	22
Figure 4: <i>Activation d'eIF2 et formation du PIC</i> .....	26
Figure 5: <i>Initiation de la traduction</i> .....	28
Figure 6: <i>Réinitiation de la traduction</i> .....	30
Figure 7: <i>Contexte Kozak et ribosome profiling (d'après Ingolia2009<sup>23</sup>)</i> .....	32
Figure 8: <i>Purification des différents facteurs d'initiation de la traduction (adapté de Grifo1983<sup>27</sup>)</i> .....	34
Figure 9: <i>Structure d'eIF4E(adapté de Siddiqui 2012<sup>28</sup>)</i> .....	36
Figure 10: <i>carte des motifs d'interaction de eIF4A</i> .....	38
Figure 11: <i>Interactome de eIF4G</i> .....	40
Figure 12: <i>Carte des motifs d'interaction de PABP</i> .....	42
Figure 13: <i>Carte des motifs d'interaction de eIF4B</i> .....	44
Figure 14: <i>Interactome et structure du complexe eIF3</i> .....	46
Figure 15: <i>Du balayage de la 40S au début de l'élongation de la traduction</i> .....	48
Figure 16: <i>les kinases d'eIF2<math>\alpha</math> (adapté de Donnelly2013<sup>90</sup>)</i> .....	50
Figure 17 : <i>Inhibition de eIF4E</i> .....	52
Figure 18: <i>Les ribosomes spécialisés</i> .....	56
Figure 19: <i>Site de clivage de eIF4G</i> .....	58
Figure 20: <i>Méthode d'étude et diversité des IRES</i> .....	60
Figure 21: <i>Remèdes contre grippe au début des années 1900</i> .....	66
Figure 22: <i>Les découvertes du pathogène de la grippe</i> .....	68
Figure 23: <i>Phylogénie et nomenclature du virus</i> .....	70
Figure 24: <i>Dérive et cassure antigénique</i> .....	76
Figure 25: <i>Calendrier de la production d'un vaccin anti-Influenza A</i> .....	78
Figure 26: <i>Réseaux de surveillance du virus</i> .....	80

Figure 27: <i>La particule virale</i> .....	82
Figure 28: <i>Le génome viral</i> .....	84
Figure 29: <i>Cycle viral</i> .....	86
Figure 30: <i>Les trois types d'ARN exprimés lors de l'infection</i> .....	88
Figure 31: <i>Le capsnatching ou vol de coiffe</i> .....	90
Figure 32: <i>Le shut off cellulaire</i> .....	92
Figure 33: <i>Détournement de la réponse antivirale par l'Influenza A</i> .....	98
Figure 34: <i>Organisation des UTR virales</i> .....	102
Figure 35: <i>Carte des motifs d'interaction de NS1</i> .....	106
Figure 36: <i>Modèle d'initiation de la traduction virale</i> .....	124
Figure 37: <i>Frise chronologique du développement des systèmes de traduction in vitro</i> .....	126
Figure 38: <i>Principe des extraits cellulaires</i> .....	128
Figure 39: <i>Les différents systèmes in vitro</i> .....	132
Figure 40: <i>Comparaison de la traduction procaryote et eucaryote</i> .....	136
Figure 41: <i>Préparation des extraits de germe de blé (adapté de Endo 2003<sup>282</sup>)</i> .....	138
Figure 42: <i>Préparation du lysat de réticulocyte de lapin (RRL)</i> .....	140
Figure 43: <i>Illustration des principales modifications post-traductionnelles</i> .....	142
Figure 44: <i>Avantages et inconvénients des différents systèmes de traduction in vitro</i> .....	144
Figure 45: <i>Mode d'action des principales drogues agissant sur la traduction</i> .....	148
Figure 46: <i>Evolution de la productivité protéique des extraits cellulaires (d'après Carlson 2012<sup>280</sup>)</i> .....	152
Figure 47: <i>Applications des extraits cellulaires</i> .....	154
Figure 48: <i>Systèmes in vitro et vaccin à la carte contre un lymphome (adapté de swartz 2006<sup>314</sup>)</i> .....	156
Figure 49: <i>Principaux substrats énergétiques ajoutés aux systèmes in vitro</i> .....	158
Figure 50: <i>Système in vitro et repliement correct des protéines néosynthétisées</i> .....	160

---

# **PARTIE I :**

# **INTRODUCTION**

---





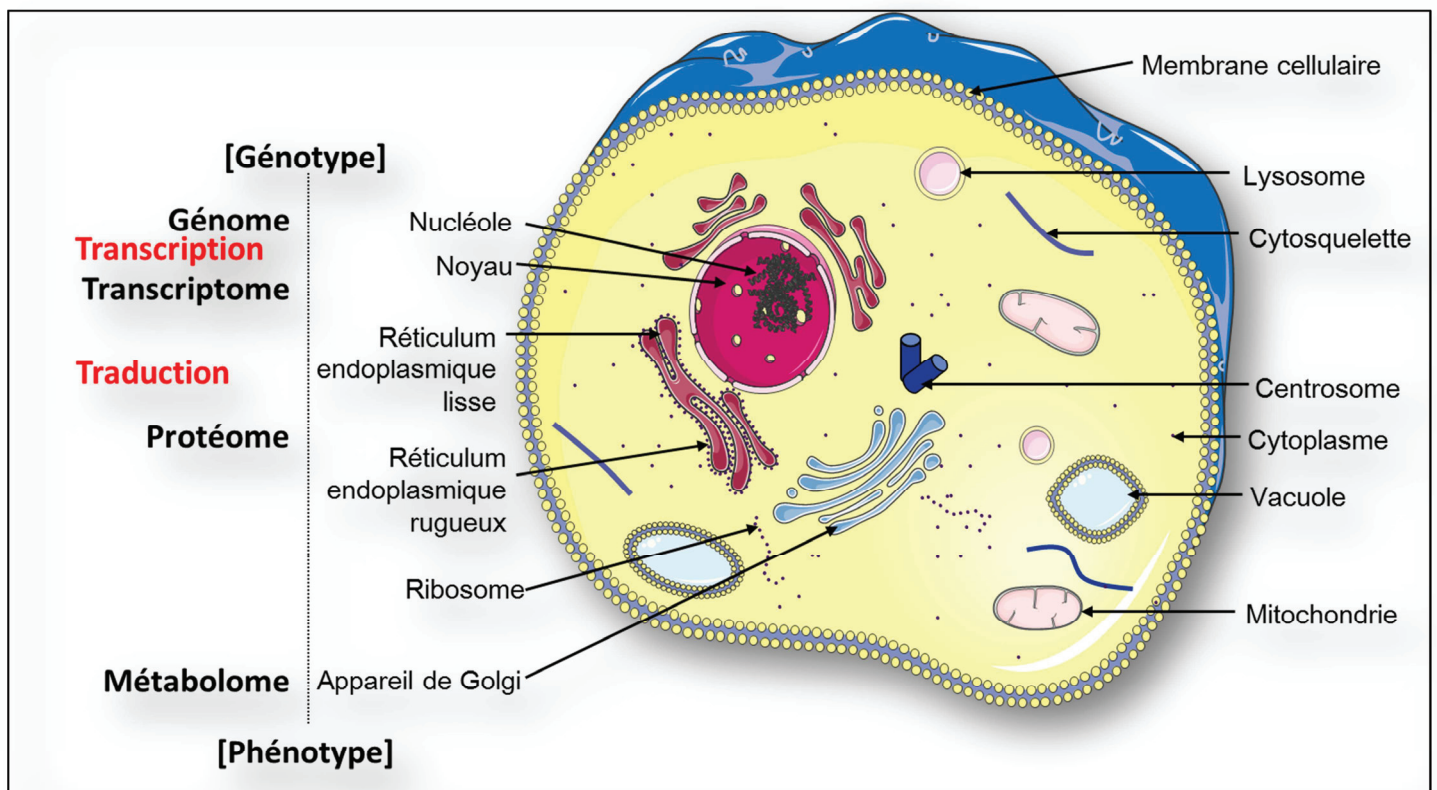


Figure 1 : *Place de la traduction dans la cellule*

Localisation de la synthèse des protéines dans le cytoplasme au niveau des ribosomes libres et du réticulum. A gauche, les différents omiques du génotype au phénotype.

# Chapitre I : La traduction eucaryote

## 1 Généralités

### 1.1 Place de la traduction dans le cycle cellulaire

L'expression de l'information génétique portée par un segment d'ADN codant pour une protéine nécessite la synthèse d'un intermédiaire qui est l'ARN messager. Génome, transcriptome, protéome et métabolome sont les produits des différentes étapes de l'expression des gènes (figure 1), et depuis les observations de Beadle et Tatum en 1941, ou plus tard de Benzer en 1958, la relation univoque un gène-une enzyme a été fortement ébranlée. En effet, la découverte en 1977 de l'épissage alternatif <sup>1</sup>, mais aussi la compréhension du gène en tant qu'unité de régulation comme l'ont proposé Jacob et Monod avec l'opéron lactose d'*Escherichia coli*, ont montré que plusieurs transcriptomes et protéomes peuvent être trouvés au sein même d'une cellule selon son cycle ou son état de différenciation. Ces observations suggèrent une régulation fine et temporelle de l'expression génique au niveau de la transcription, de la maturation, de l'export, de la stabilité de l'ARNm et au niveau de sa traduction. Alors que chez les procaryotes, transcription et traduction sont synchrones, le processing de l'ARNm est une étape intermédiaire spécifique aux eucaryotes. La traduction se définit par la synthèse d'un polypeptide à partir d'un ARNm. La lecture du code génétique est permise par le ribosome qui positionne le bon acide aminé grâce à un aminoacyl-ARNt possédant une séquence complémentaire d'un triplet nucléotidique, ou codon situé sur l'ARNm, et qu'il reconnaît. Ce mécanisme est conservé pour l'ensemble du vivant.

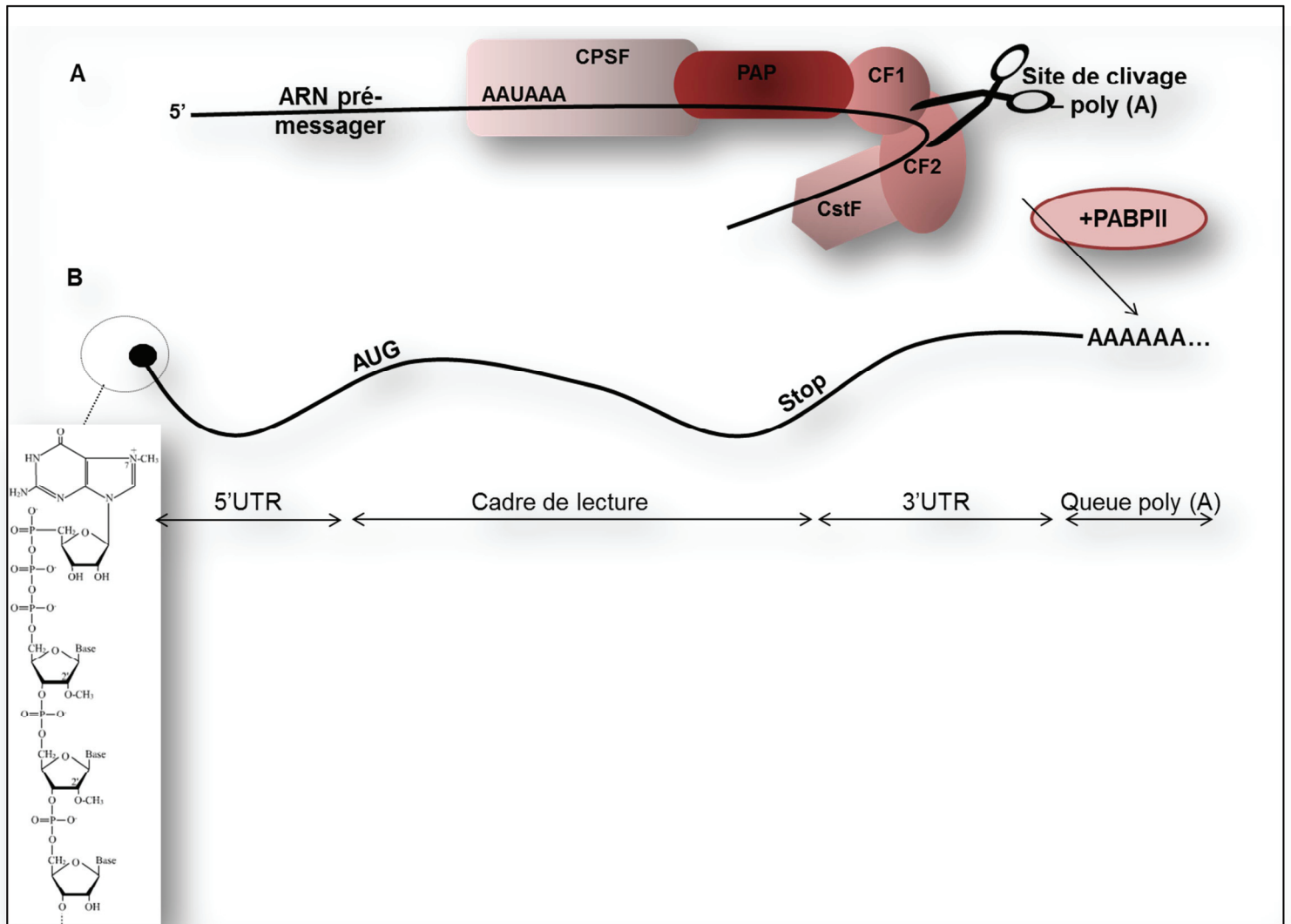


Figure 2: *Polyadénylation de l'ARNpré-messenger et organisation de l'ARNmessenger*

- (A) L'ARNpré-m en cours de transcription interagit avec le facteur spécifique de clivage polyadénylation (CPSF) au niveau du site consensus AAUAAA qui recrute les facteurs de clivage (CF1 et CF2) par la poly(A) polymérase (PAP). Les deux CF vont ensuite cliver l'ARNpré-m environ 30 nucléotides après le site AAUAAA ce qui nécessite le facteur de stimulation du clivage (CstF). La queue poly(A) est ajoutée par des protéines de liaison aux poly(A) de type II (PABPII).
- (B) L'ARNm se compose d'un cadre de lecture délimité par un codon initiateur (AUG) et d'un codon stop et borné en 5' par une région non codante (5'UTR) qui contient une coiffe de 7-méthyl-guanine triphosphate à son extrémité et en 3' par une région non codante (3'UTR) qui se termine par une queue poly(A) d'environ 200 nucléotides chez les eucaryotes.

Cependant la régulation de la traduction est très différente entre les procaryotes et eucaryotes. Cette régulation fait intervenir de nombreux facteurs régulateurs ainsi que l'architecture de l'ARNm. L'étude biochimique de l'expression des gènes montre que ses différentes phases nécessitent beaucoup d'énergie. Cependant, c'est la traduction qui est la plus coûteuse et mobilise plus de la moitié des ressources énergétiques cellulaires. C'est également une étape qui permet l'amplification de l'expression d'un gène car un ARNm peut-être traduit de nombreuses fois successivement ou simultanément formant des regroupements de ribosomes sur un même ARNm appelés polysomes. La traduction est également un processus rapide et qui est finement régulé <sup>2</sup>.

## **1.2 Structure de l'ARNm eucaryote nécessaire pour la traduction**

Chez les eucaryotes la synthèse des pré-messagers est réalisée par l'ARN polymérase II, mais d'autres complexes interviennent comme l'enzyme de capping qui est associée avec le domaine CTD phosphorylé de l'ARN polymérase II et qui permet l'addition d'une "coiffe" de 7-méthylguanosine en 5' de l'ARN messager très tôt après l'initiation de la transcription (25 à 50 nucléotides). L'ajout d'une queue poly(A) en 3' de l'ARNm se fait après clivage du transcrit primaire par le facteur de clivage (CPSF) puis la poly(A) polymérase (PAP) ajoute une trainée de résidus adénylates <sup>3</sup> d'environ 200 nucléotides chez les Mammifères <sup>4,5</sup> (figure 2). La coiffe en 5' et la queue poly(A) en 3' stabilisent l'ARNm et interviennent dans le recrutement des différents facteurs indispensables à l'initiation de la traduction. De part et d'autre de la région codante bornée par un AUG initiateur en 5' et un codon stop en 3', l'ARNm contient des régions non traduites en 5' et en 3' (5'UTR et 3'UTR) qui toutes deux influencent l'efficacité de traduction de l'ARNm ou interviennent dans le processus de contrôle traductionnel de cet ARNm.

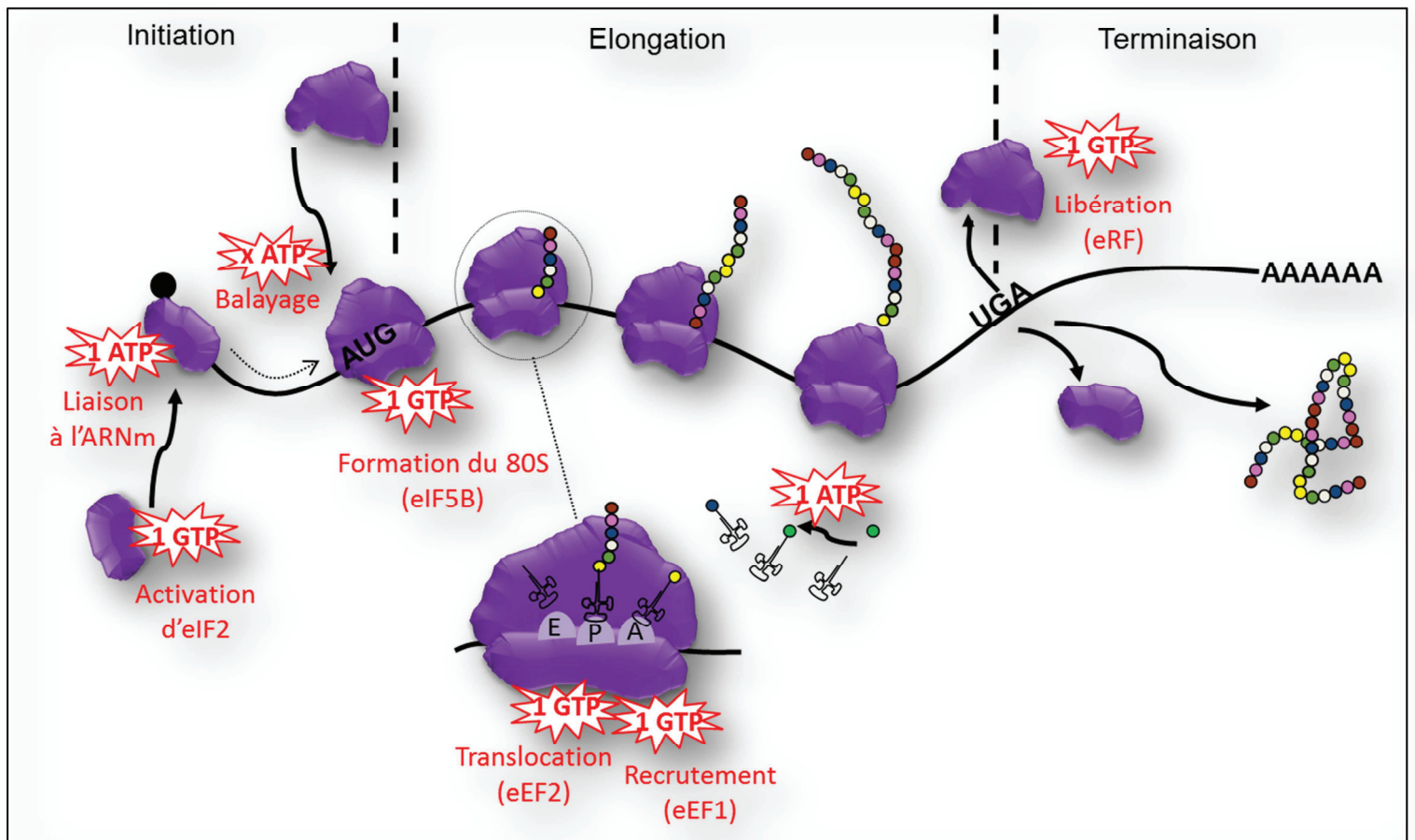


Figure 3: Les trois étapes de la traduction et coût énergétique

L'initiation regroupe l'arrimage de la petite sous-unité ribosomale dans la 5'UTR qui balaie l'ARNm jusqu'au codon initiateur où la grande sous-unité ribosomale est recrutée à son tour. Puis le polypeptide est synthétisé par le ribosome qui decode l'ARNm et utilise les différents ARNt-amino-acylés lors de l'élongation. Enfin, le ribosome et le polypeptide néosynthétisé sont libérés au niveau du codon stop lors de la terminaison. Ces trois étapes nécessitent de l'énergie apportée sous forme de GTP et d'ATP.

La région 3'UTR est particulièrement étudiée dans les mécanismes de régulation par les microARN (miARN) <sup>6</sup> et son rôle ne sera pas développé dans cette thèse. La région 5'UTR est au cœur des processus d'initiation de la traduction chez les eucaryotes et son rôle sera tout particulièrement analysé.

## **2 Présentation globale de la traduction eucaryote**

La traduction peut-être décomposée en trois phases : l'initiation, l'élongation et la terminaison (figure 3).

L'initiation englobe l'ensemble des réactions qui précèdent la formation de la liaison peptidique entre les deux premiers acides aminés de la protéine. Elle nécessite la liaison du ribosome sur la partie 5' de l'ARNm et la formation d'un complexe d'initiation qui contient le premier aminoacyl ARNt : cette étape est relativement lente et requiert des facteurs d'initiation eucaryotes (eIF).

L'élongation comprend toutes les réactions à partir de la formation de la première liaison peptidique jusqu'à l'addition du dernier acide aminé. C'est au cours de cette étape qu'a lieu le processus de décodage, il est rendu possible par le ribosome, qui d'une part catalyse la liaison peptidique entre la chaîne polypeptidique déjà formée, et l'acide aminé spécifiquement apporté par l'ARN de transfert (ARNt) qui arrive sur le premier (A) des trois sites de fixation qu'il porte. Ces trois sites sont : un site aminoacyl (A), un site peptidyl (P) et un site de sortie (E). Ces trois sites E-P-A sont orientés dans le sens 5' - 3' de l'ARNm qui est le sens de lecture du ribosome. La chaîne polypeptidique s'allonge donc lors du passage de l'ARNt du site A au site P. Lorsque l'ARNt se trouve sur le site E, un autre ARNt activé entre au niveau du



site A et ce processus itératif se répète autant de fois qu'il y a d'acides aminés dans la protéine à synthétiser. L'élongation est un processus qui nécessite de l'énergie, permise par l'hydrolyse du GTP (certains facteurs d'élongation ont une activité GTPase), à la fois pour permettre la translocation du ribosome, mais aussi pour introduire des étapes thermodynamiquement irréversibles qui participent à la fidélité de la traduction. La vitesse de synthèse d'une protéine est d'environ 100 acides aminés ajoutés par minute <sup>7</sup>.

La terminaison regroupe les étapes nécessaires à la libération de la chaîne polypeptidique et se produit lorsque le site A du ribosome rencontre un codon stop (UAA, UAG ou UGA). Le codon stop induit le recrutement de facteurs de terminaison eucaryotes (eRF) 1, 2 et 3 qui provoquent la dissociation du ribosome sur l'ARNm. Ces facteurs peuvent également s'associer aux eIFs pour réinitier la traduction sur le même ARNm <sup>8</sup>.

### **3 L'initiation de la traduction : étape finement régulée**

L'initiation de la traduction eucaryote se découpe en deux étapes distinctes qui sont d'abord la reconnaissance de l'extrémité 5' de l'ARNm par la petite sous-unité du ribosome associée aux facteurs d'initiation de la traduction et formant le complexe 43S, puis le balayage de la région 5'UTR de l'ARNm jusqu'au codon d'initiation. Ces étapes font intervenir des régions cis-régulatrices de l'ARNm ainsi que des facteurs agissant en trans. La découverte historique des différents complexes qui interviennent dans l'initiation de la traduction débute au milieu des années 70 jusqu'aux années 80. L'importance des séquences *cis*-régulatrices sera mis en évidence avec l'étude des picornavirus dans les années 80.



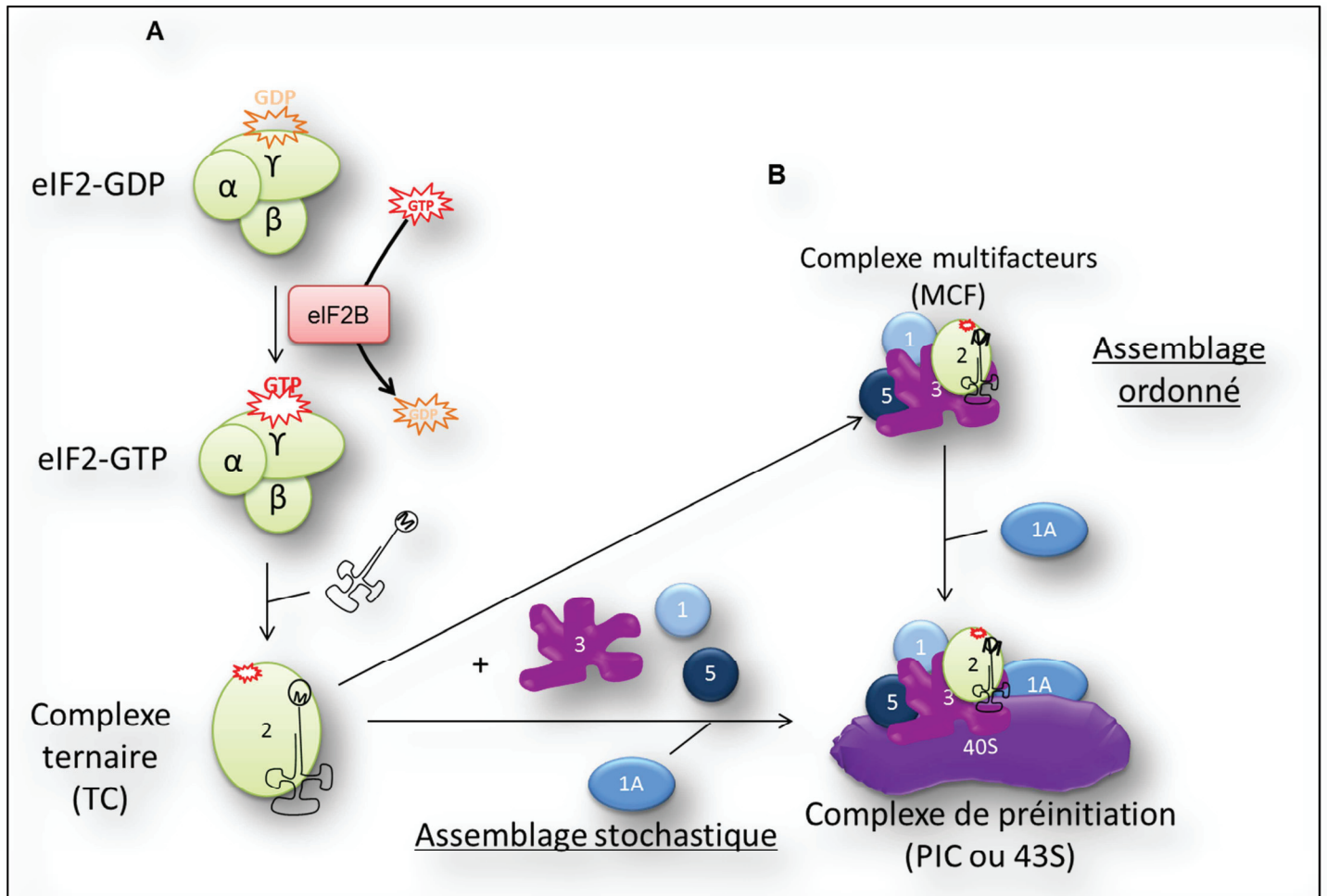


Figure 4: Activation d'eIF2 et formation du PIC

Le GDP porté par le complexe eIF2 est remplacé par du GTP grâce au facteur eIF2B ce qui permet la liaison de l'ARNt initiateur et la formation du complexe ternaire. Puis le TC est recruté à la 40S soit par un assemblage stochastique où chaque facteur d'initiation du PIC est recruté indépendamment, soit en passant par un assemblage ordonné préalable constitué de eIF3, eIF1, eIF2 et eIF5.

### 3.1 La formation du complexe ternaire puis du 43S

La formation du complexe de préinitiation 43S (PIC) commence par l'activation du complexe ternaire (TC) (figure 4). Le TC est constitué du facteur eIF2 qui comporte trois sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ). eIF2 $\gamma$  lie une molécule de GTP et l'ARNt-méthionine initiateur (ARNt-Met) <sup>9</sup>, la sous-unité  $\beta$  interagit avec l'ARNt-Met et l'ARNm <sup>9,10</sup> et la sous-unité  $\alpha$  régule le recyclage de la forme eIF2-GDP inactive à la forme eIF2-GTP active. Le TC activé s'associe à la petite sous-unité ribosomale 40S pour constituer le PIC. Cette association est permise par l'interaction avec les facteurs eIFs 1, 1A, 5 et 3 qui sont connus pour lier directement la 40S à l'exception d'eIF5 <sup>10</sup>. Le modèle d'assemblage du PIC se présente actuellement de deux manières possibles (figure 4); (i) un assemblage stochastique des différents facteurs comme dans le modèle procaryote où chaque facteur d'initiation se lie individuellement à la 40S, (ii) un assemblage ordonné propre aux eucaryotes où les facteurs eIF1, eIF3 et eIF5 s'associent d'abord au TC pour constituer un complexe multifacteur (MFC) qui forme une unité pré-organisée recrutée via eIF1A sur la 40S <sup>11-13</sup>.



### **3. 2 Assemblage du complexe de préinitiation (PIC) sur l'ARNm**

Le PIC (ou 43S) est recruté au niveau de la région 5' coiffée de l'ARNm grâce d'une part, à une interaction directe entre la coiffe et la protéine eIF4E qui fait partie d'eIF4F et d'autre part grâce à une interaction entre les complexes eIF4F et eIF3 pour constituer le complexe 48S (PIC+ARNm) (figure 5). C'est la protéine eIF4G du complexe eIF4F qui assure la liaison avec eIF3 chez les Mammifères. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l'interaction eIF4G -eIF3 n'a pas été détectée et il a été proposé que ce soit eIF5 qui joue un rôle d'intermédiaire dans cette interaction <sup>14</sup>. Il semble plausible, au vu des publications plus récentes, que eIF3 soit plus indispensable que eIF4G au recrutement du PIC sur l'ARNm <sup>15,16</sup>. La stabilité de l'interaction PIC-ARNm près de la coiffe dépend de la structure de la 5'UTR et l'hélicase eIF4A joue un rôle prépondérant.

### **3.3 Le balayage de la petite sous-unité ribosomale jusqu'au codon initiateur**

Chez les procaryotes, l'initiation de la traduction fait intervenir un appariement spécifique entre une séquence de l'ARNm, dite séquence de Shine-Dalgarno, et la partie 3' de l'ARNr 16S de la sous-unité 30S du ribosome. Cette interaction permet un positionnement direct de la petite sous-unité 30S avec le codon initiateur dans son demi site P. Chez les eucaryotes, le ribosome 40S doit rechercher l'AUG initiateur le long de la 5'UTR par un mouvement de balayage ou « scanning » <sup>17</sup>. Le scanning a initialement été mis en évidence par Kozak et Shatkin <sup>18</sup> qui ont utilisé l'édéine, une drogue qui empêche la 40S de se fixer sur l'AUG initiateur. Des expériences de retard sur gel et séquençage ont ainsi permis de montrer que la 40S est principalement retrouvée dans la région 5'UTR de l'ARNm et scanne cette région jusqu'au codon initiateur (figure 5). Nous n'entrerons pas dans les détails du

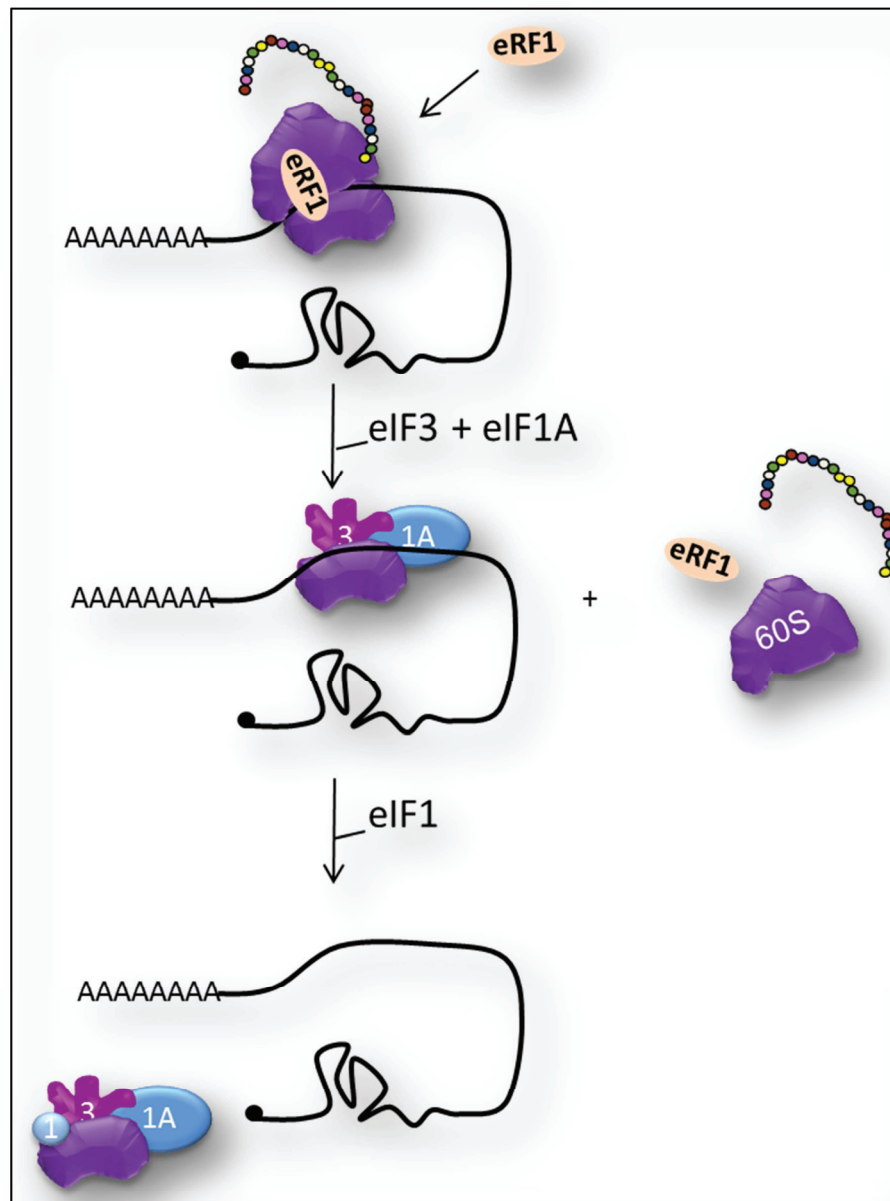


Figure 6: *Réinitiation de la traduction*

Lorsque le ribosome arrive au niveau d'un codon stop, le facteur de relargage 1 (eRF1) stoppe sa progression, puis l'interaction d'eIF3 et eIF1A avec la 40S permet la libération d'eRF1, de la 60S et du polypeptide néosynthétisé. Le facteur eIF1 permet de dissocier l'ARNm de la 40S dont la région 5' est proche des différents facteurs d'initiation pour induire sa lecture *de novo*.

scanning mais précisons que celui-ci est régulé par la longueur et la structure des 5'UTR <sup>19</sup> et des hélicases additionnelles peuvent intervenir dans ce mécanisme <sup>20</sup>.

### **3.4 Le recyclage des ribosomes**

Un même ARNm est traduit de nombreuses fois permettant l'amplification du signal d'expression génique. Il est de plus en plus clair que le recyclage des ribosomes intervient directement dans l'efficacité de la traduction (figure 6). Le complexe ribosomal post terminal constitué du ribosome 80S et du facteur de terminaison eRF1 serait partiellement recyclé par les facteurs d'initiation. Ainsi, eIF3 et eIF1A recruterait la sous-unité 40S en libérant la sous-unité 60S et l'attachement d'eIF1 sur la 40S permettrait son détachement de l'ARNm au niveau du site de terminaison <sup>8</sup>. La relecture de l'ARNm nécessiterait également un complexe ternaire et elle n'aurait lieu que si le complexe eIF4F est recruté durant le premier cycle de traduction <sup>21,22</sup>.

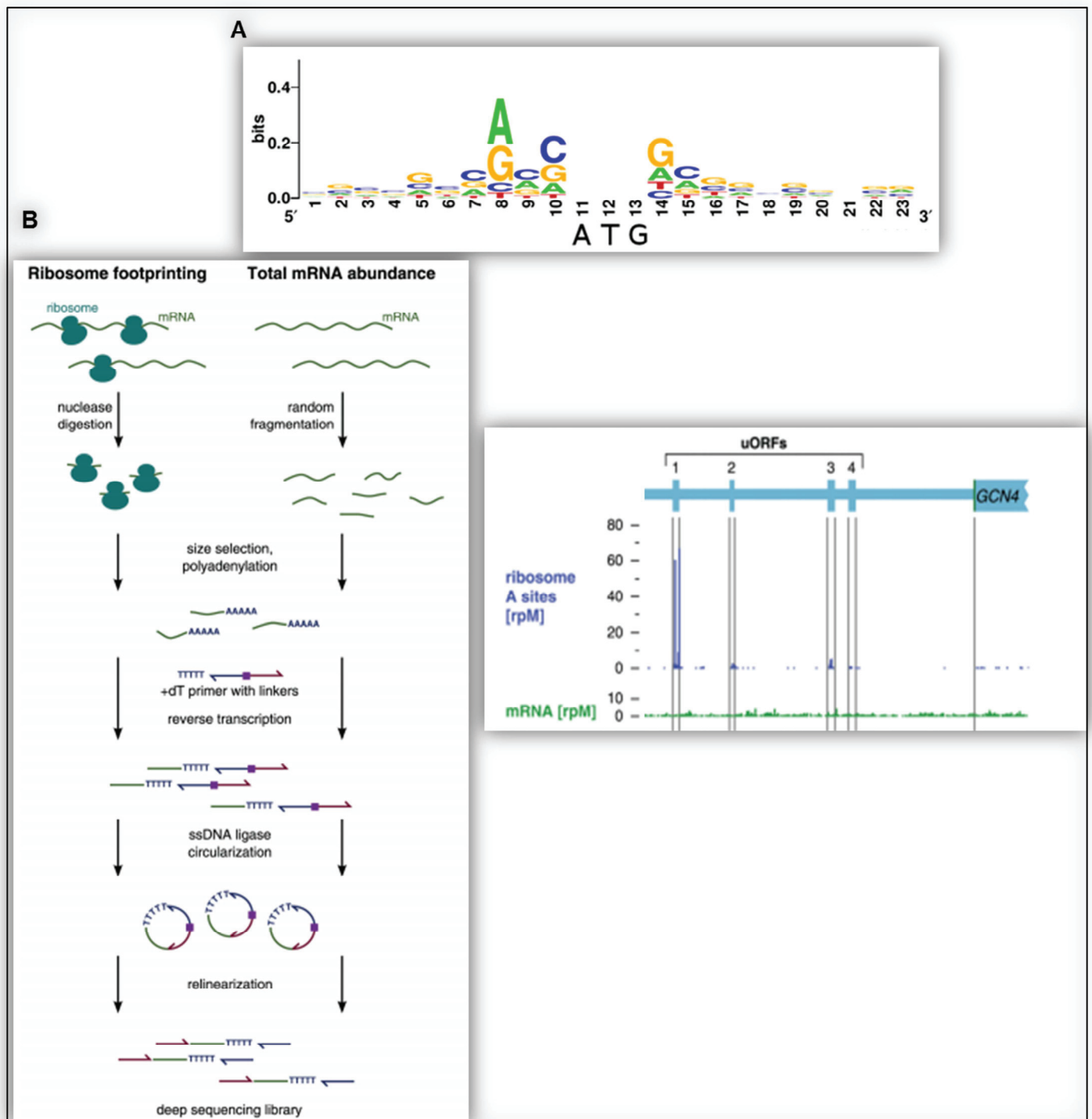


Figure 7: *Contexte Kozak et ribosome profiling (d'après Ingolia2009<sup>23</sup>)*

(A) Le contexte Kozak est défini par une surreprésentation de nucléotides autour de l'AUG initiateur dont le A ou G en position -3 et le G en position +4.

(B) Schéma du principe de ribosome profiling développé par Ingolia et collègues et uORF du gène GCN4.

## 4 Les acteurs de l'initiation de la traduction

### 4.1 Recrutement du ribosome et contexte nucléotidique autour de l'AUG

Les travaux de Marilyn Kozak dans les années 1980 ont permis de caractériser l'importance de la 5'UTR de l'ARNm et du contexte nucléotidique qui entoure le codon AUG initiateur. Une étude empirique basée sur l'analyse de 699 ARNm combinée à des expériences de mutagenèse dirigée ont permis de mettre en évidence un contexte nucléotidique favorable à la reconnaissance de l'AUG initiateur<sup>24,25</sup>. Ce contexte se définit comme suit : **G/A**nn**AUGG** avec une purine en position -3 de l'AUG et une guanine en position +4 qui sont les déterminants essentiels pour définir un bon contexte, appelé contexte Kozak (figure 7). Ainsi, si le ribosome rencontre un codon AUG dont le contexte Kozak est défavorable, il sera alors ignoré jusqu'au prochain codon AUG et on parle alors de « leaky scanning ». En utilisant des constructions contenant des 5'UTR de taille variable mais non structurées, Kozak a également démontré que le premier AUG n'est pas reconnu si la région 5'UTR a une taille inférieure à 12 nucléotides<sup>26</sup>, la traduction débute alors au second AUG<sup>19,26</sup>. On observe aussi un ratio d'expression entre le premier AUG et le second qui va s'inverser avec l'augmentation de la taille de la 5'UTR<sup>26</sup>. Avec l'obtention de données issues de méthodes à haut débit, les règles de Kozak ont été revues. En l'occurrence, la technique de ribosome profiling développée par Ingolia et collègues a permis de mettre en évidence de nombreux sites d'initiation en amont du cadre de lecture conventionnel (uORF) ainsi que des codons initiateurs non conventionnels (CUG, GCG...) <sup>23</sup> (figure 7).



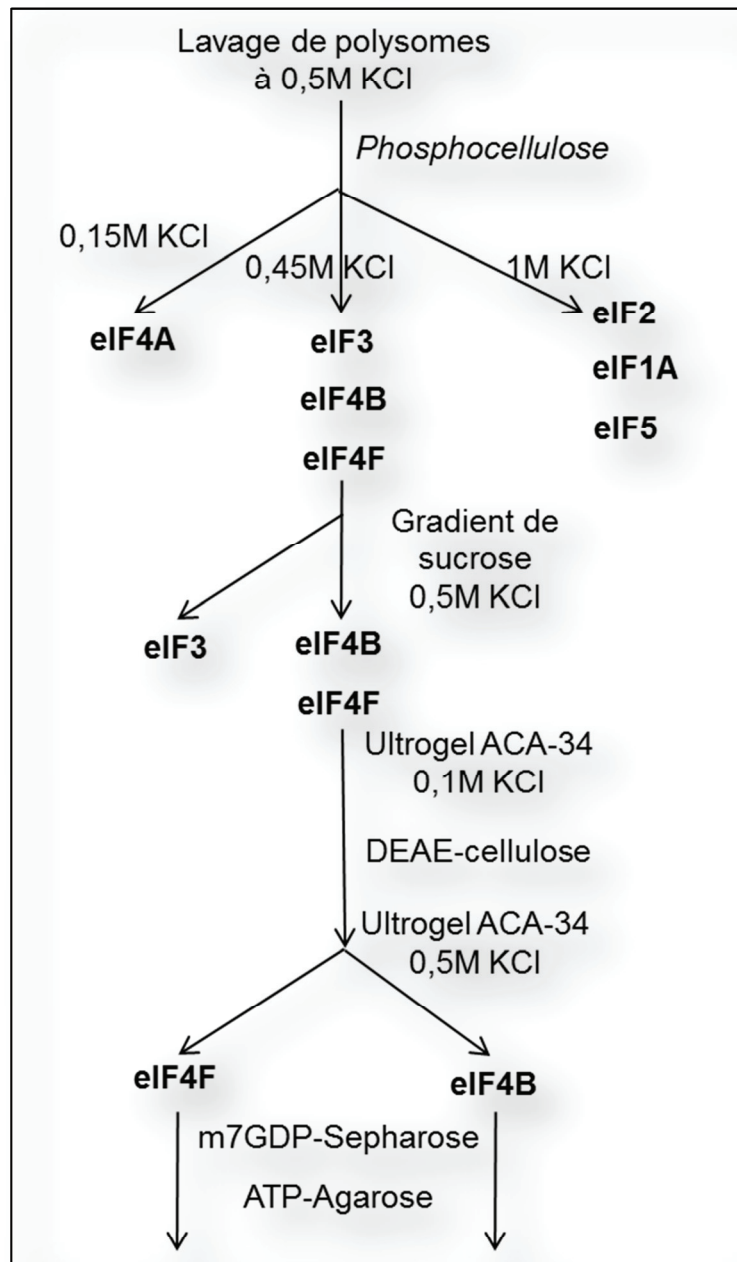


Figure 8: *Purification des différents facteurs d'initiation de la traduction (adapté de Grifo1983<sup>27</sup>)*

Méthode historique de purification des différents facteurs d'initiation de la traduction.

## **4.2 Le complexe eIF4F, indispensable à toute initiation coiffe dépendante de la traduction**

eIF4F a été initialement isolé d'une fraction polysomale après plusieurs lavages à forte concentration saline ce qui montre sa forte interaction avec les ribosomes (figure 8). Ce complexe est un hétérotrimère constitué de eIF4E, eIF4G et eIF4A qui a été caractérisé comme ayant la capacité de stimuler la synthèse *in vitro* de l'ARNm de globine <sup>27</sup>.

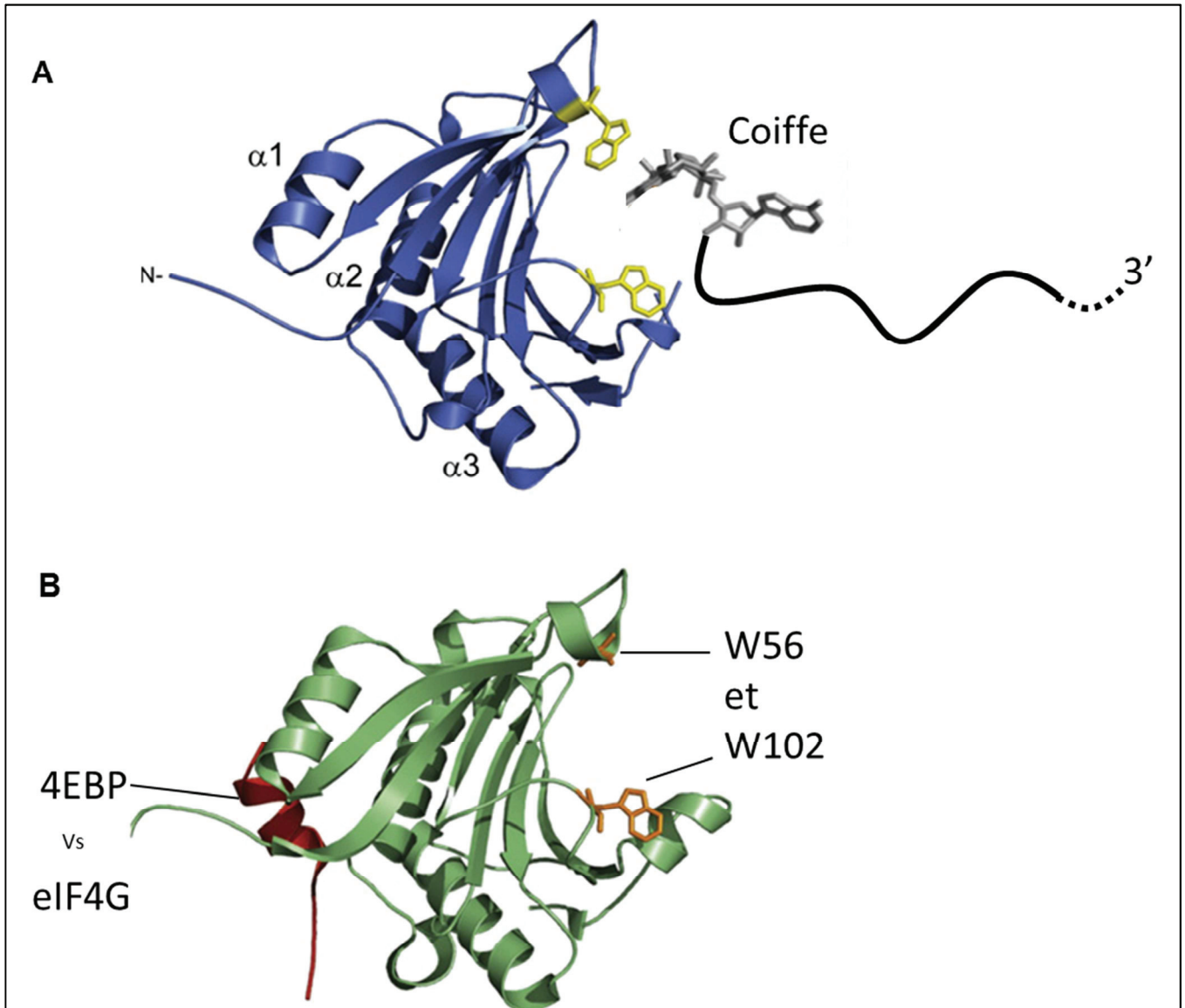


Figure 9: *Structure d'eIF4E*(adapté de Siddiqui 2012 <sup>28</sup>)

(A) Interaction de eIF4E avec la coiffe de l'ARNm.

(B) Modification de la cavité en présence de 4EBP. Les tryptophanes W56 et W102 jouent un rôle crucial dans cette interaction.

#### 4.2.1 eIF4E, la tour de contrôle

eIF4E est la protéine qui reconnaît la coiffe des ARNm<sup>29,30</sup> par une interaction forte entre deux résidus tryptophane dans une cavité de la protéine et le résidu 7-méthylguanosine<sup>31</sup> (figure 9). eIF4E interagit aussi avec eIF4G par sa face dorsale ce qui permet une liaison plus affine de eIF4E à la coiffe<sup>32</sup>. Réciproquement, cette interaction induit un changement conformationnel de eIF4E qui favorise sa liaison à eIF4G<sup>33</sup>. eIF4E peut être titré *in vitro* par l'ajout d'analogues moléculaires de la coiffe qui sont des mononucléotides méthylés ce qui permet d'étudier son rôle dans la régulation de l'initiation de la traduction. *In vivo*, l'un des moyens dont dispose la cellule pour réguler de façon globale les traductions cellulaires, est de jouer sur la capacité de reconnaissance entre eIF4E et la coiffe des ARNm. Cette régulation passe par des protéines de liaison à eIF4E qui appartiennent à la famille des 4E binding protein (4EBPs). Trois 4EBPs ont été décrites chez les Mammifères et sont régulées par un jeu de phosphorylation à partir de la voie de signalisation ciblées par la rapamycine (la voie mTOR)<sup>34,35</sup>. Les 4EBPs se lient à eIF4E avec une forte affinité et se dissocient une fois phosphorylées. De plus, le site de liaison de 4EBP à eIF4E est le même que celui qui fixe eIF4G<sup>36</sup>.

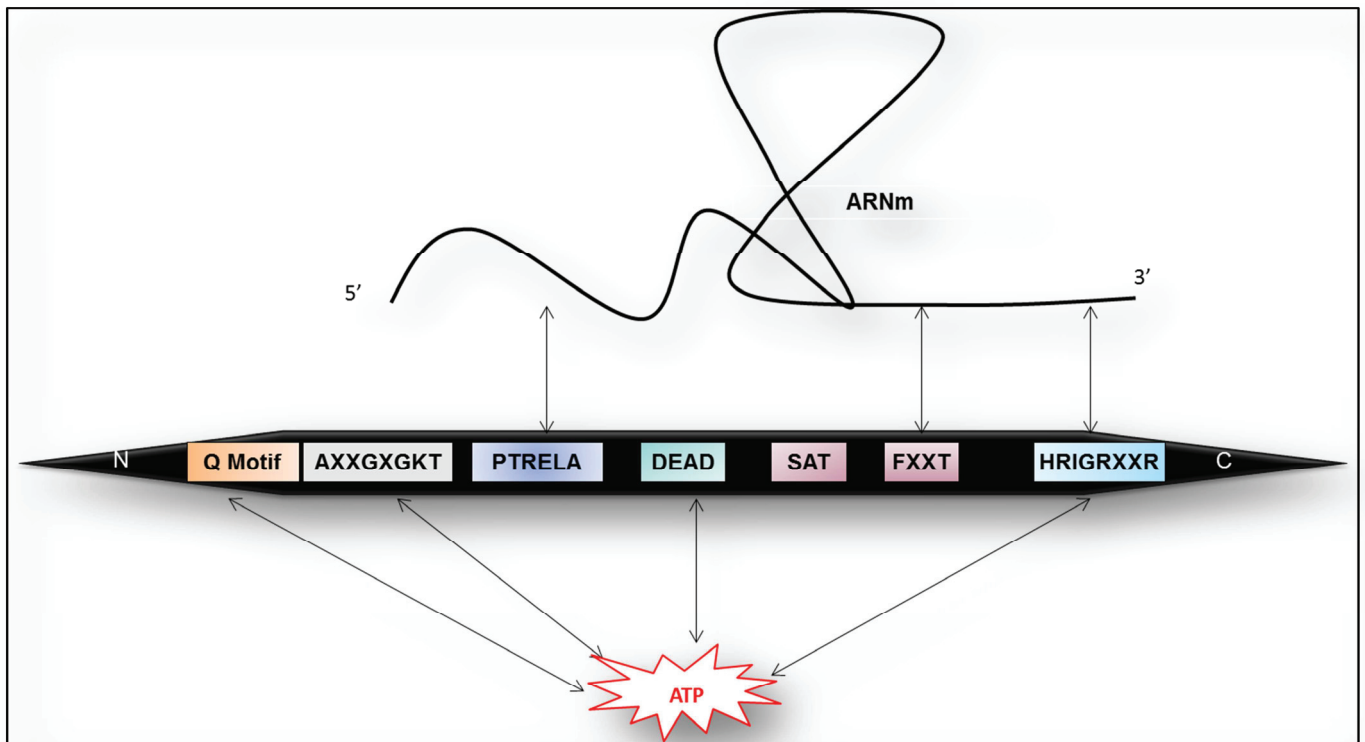


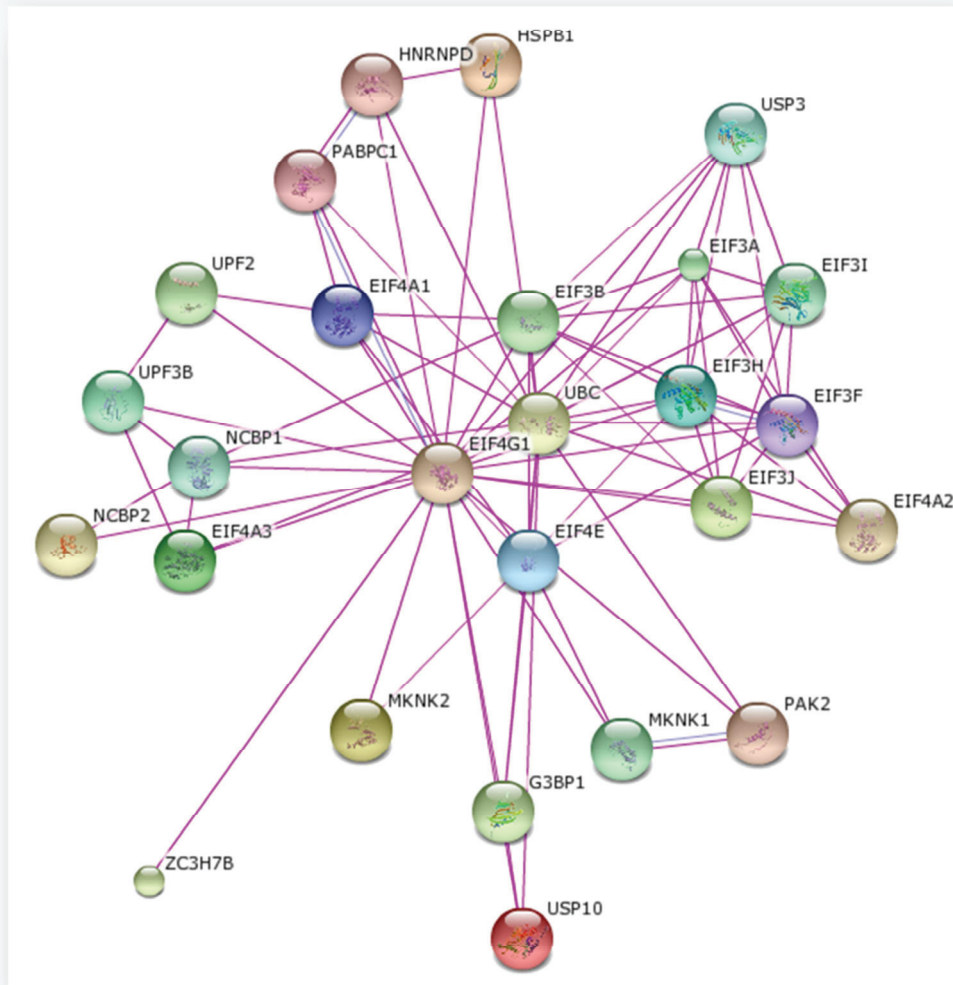
Figure 10: *carte des motifs d'interaction de eIF4A*

eIF4A possède trois sites de reconnaissance de l'ARNm et quatre motifs capables d'utiliser l'ATP comme substrat dont le domaine central DEAD très conservé qui est un critère de classification de cette protéine dans la grande famille des hélicases à domaine DEAD.

#### 4.2.2 eIF4A prépare la plateforme pour l'arrimage

eIF4 est une hélicase bidirectionnelle ATP et ARN dépendante et possède la capacité de dérouler les structures secondaires de l'ARNm pour favoriser la progression du complexe d'initiation de la traduction à l'AUG initiateur. L'étude structurale de eIF4A a permis de mettre en évidence un motif très conservé parmi de nombreuses hélicases appelé DEAD-box qui est constitué d'une séquence d'aspartate-glutamate-alanine-aspartate <sup>37</sup> (figure 10). Cette même étude a révélé d'autres domaines très conservés parmi la famille des hélicases à domaine DEAD <sup>37</sup>. L'activité de eIF4A est fortement stimulée par le facteur eIF4B au sein du complexe 4F <sup>38,39</sup>. L'hippuristanol, un inhibiteur de l'hélicase eIF4A, interagit au niveau du domaine de liaison de eIF4A sur l'ARN <sup>40</sup>. Il a largement été utilisé au cours de ces dernières années notamment pour caractériser des ARNm structurés qui n'ont pas besoin de eIF4A pour initier la traduction <sup>40</sup>.

**A**



**B**

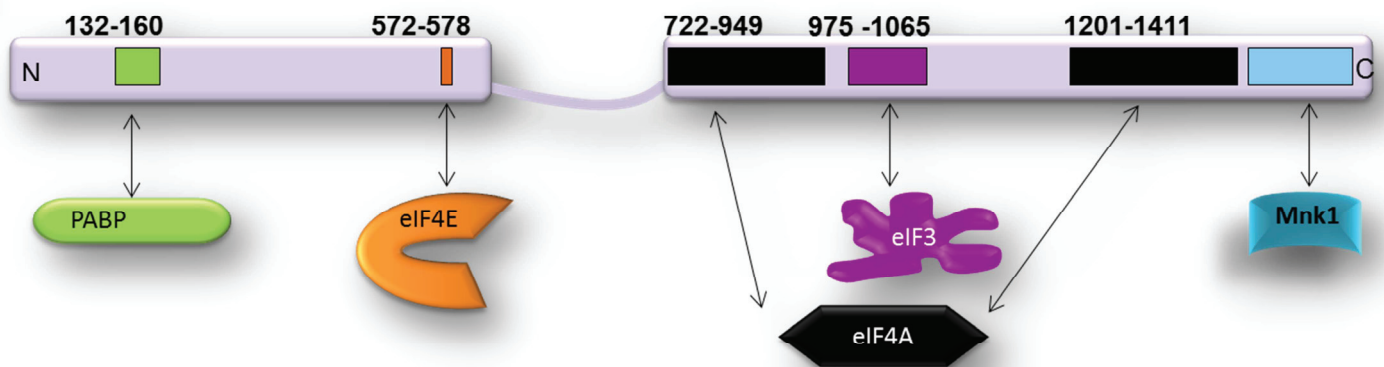


Figure 11: *Interactome de eIF4G*

(A) Interactome de eIF4G (d'après le site internet [www.genecards.org](http://www.genecards.org)).

(B) Domaines d'interaction de la protéine avec les différents facteurs qui interviennent dans l'initiation de la traduction.

#### 4.2.3 eIF4G, l'enrôleur

eIF4G est une protéine pivot qui fait le lien entre L'ARNm et le recrutement de la sous-unité ribosomale 40S. Elle coordonne l'activité coiffe dépendante en se liant à eIF4E au niveau de son domaine N-terminal <sup>41</sup> ainsi que l'activité ARN hélicase de eIF4A en la liant au niveau de son domaine médian et C-terminal <sup>42</sup> (figure 11). Ce domaine lie également le complexe eIF3 pour recruter la sous-unité 40S <sup>43</sup>. Bien que proches, les interactions de eIF4G avec eIF4E et eIF3 ne sont pas mutuellement exclusives mais coopératives <sup>44</sup>. Lors du détournement de la machinerie traductionnelle par les virus, l'intégrité de eIF4G est fréquemment modifiée par clivage <sup>45-47</sup>.



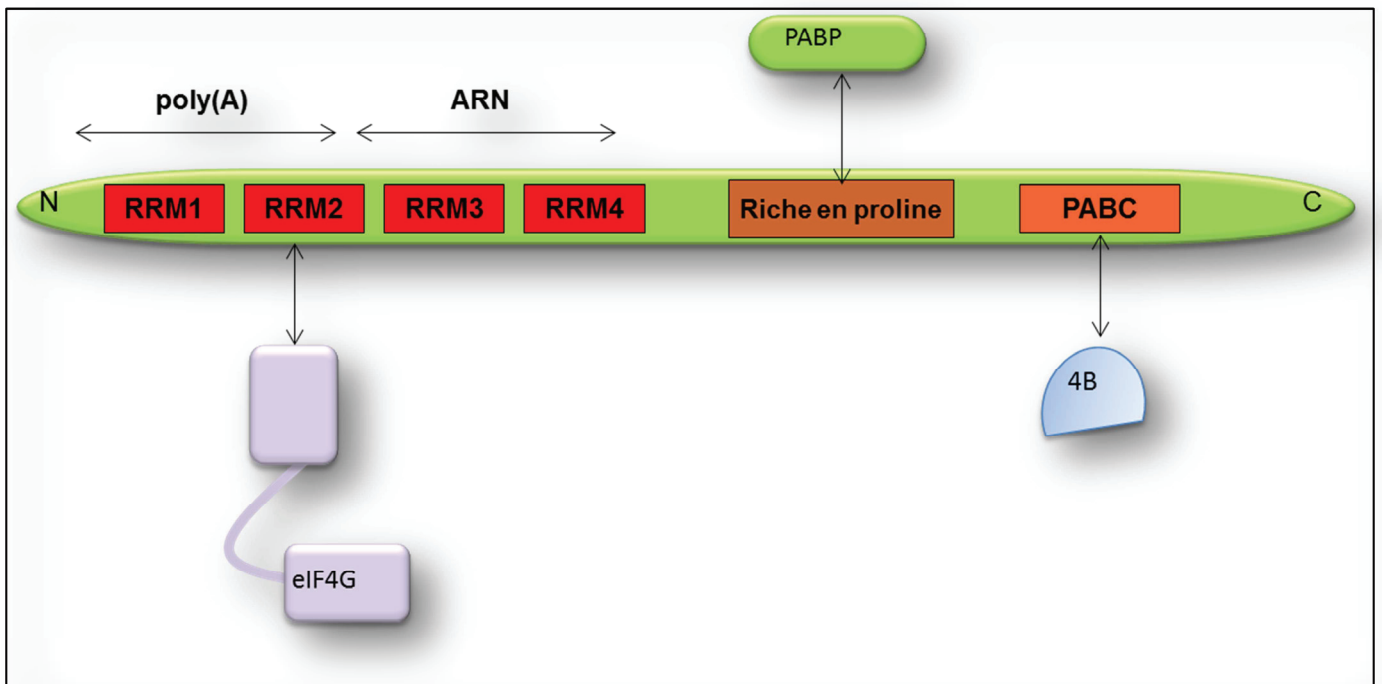


Figure 12: *Carte des motifs d'interaction de PABP*

Domaine d'interaction de PABP avec les facteurs qui interviennent dans l'initiation de la traduction dont les motifs de reconnaissance à l'ARN (RRM).

### 4.3 La queue poly(A) et PABP

Les poly(A) binding protein (PABP) constituent une famille caractérisées par leur capacité à lier les séquences ARN riches en adénosines. Chez l'Homme, il existe 4 différentes PABP cytoplasmiques qui jouent de multiples rôles dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique <sup>48</sup>. Parmi celles-ci, la PABPI a été très étudiée pour son rôle dans l'initiation de la traduction. Elle se compose de 4 domaines de liaison à l'ARN (RRM) en position N-terminale <sup>49</sup> dont seuls les deux premiers ont une forte spécificité pour les résidus adénylates <sup>50</sup> (figure 12). Le domaine C-terminal contient un site de dimérisation suivi d'un domaine PABC permettant de nombreuses interactions protéine/protéine telles que PAIPI et PAIPII <sup>51</sup>. PABPI lie la queue poly(A) sur 12 nucléotides mais recouvre 25 à 27 nucléotides et peut multimériser le long de la queue poly(A) <sup>52-54</sup>. Des études *in vitro* ont permis de montrer très tôt que la queue poly(A) augmente l'efficacité de la traduction <sup>55</sup> mais il a longtemps été admis que c'était surtout en stabilisant l'ARNm. Puis, les observations de polysomes en microscopie électronique ont permis de constater des structures circulaires de l'ARNm en cours de traduction <sup>56,57</sup>. A partir de ces observations, un modèle de circularisation d'un ARNm prêt à être traduit a été établi <sup>58</sup>. Cependant, il faudra attendre les travaux de Tarun et Sachs en 1996 <sup>59</sup> montrant l'interaction de PABP avec eIF4G pour valider le rapprochement entre les régions 5' et 3' d'un ARNm en cours de traduction. Cette mise en évidence initialement réalisée sur le modèle de levure, a également été observée chez les Mammifères <sup>60,61</sup>. Il a été montré que lors du développement embryonnaire, la circularisation de l'ARNm permettrait à des protéines interagissant avec la partie 3' de l'ARNm de réguler l'initiation de la traduction grâce à des interactions avec eIF4F <sup>62</sup>. De plus, PABP stimulerait le recrutement de la grosse sous-unité ribosomale 60S <sup>63,64</sup>. Enfin, il

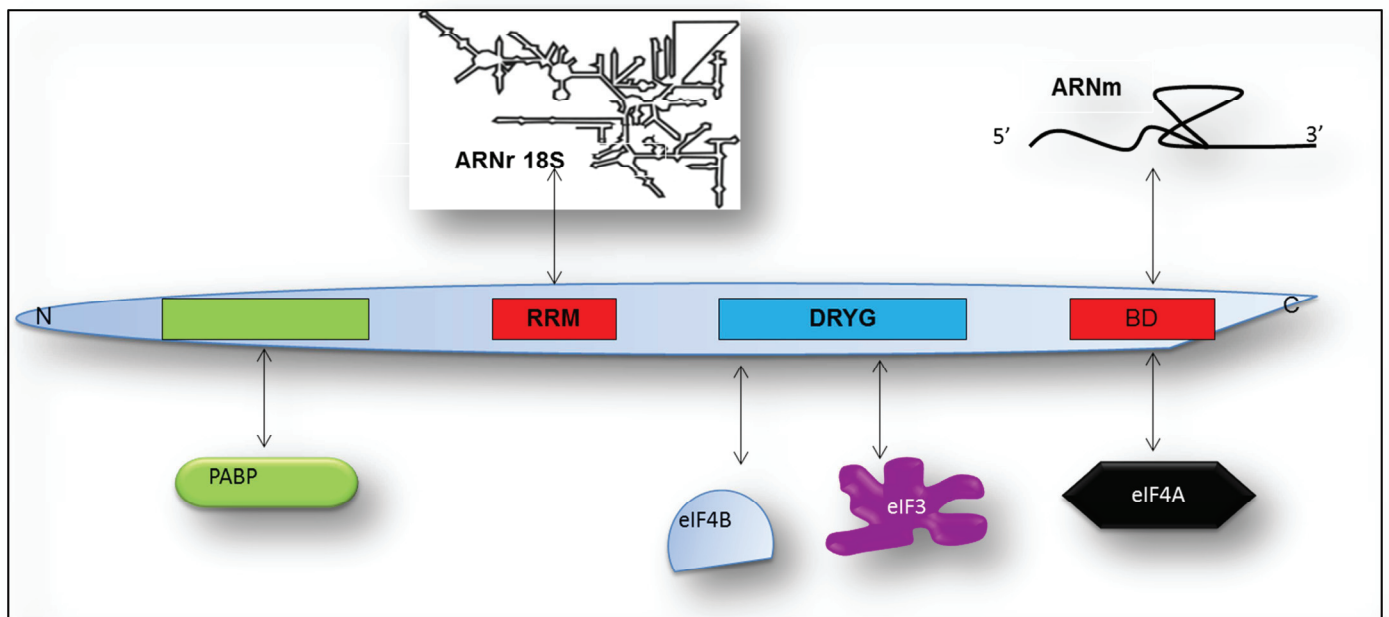


Figure 13: *Carte des motifs d'interaction de eIF4B*

Domaine d'interaction de eIF4B avec les facteurs qui interviennent dans l'initiation de la traduction dont les motifs de reconnaissance à l'ARN (RRM et BD).

est intéressant de noter que l'absence d'une queue poly(A) sur un ARNm peut être compensée *in vitro* par l'ajout de poly(A) libre qui agirait en *trans* via PABP <sup>65</sup>. Par ailleurs, PABP joue un rôle très important dans le mécanisme de contrôle de la traduction par les miARNs à travers son interaction avec la sous unité GW182 du complexe RISC <sup>66,67</sup>.

#### **4.4 eIF4B, un complément indispensable**

eIF4B est une phosphoprotéine qui assure de multiples fonctions dans l'initiation de la traduction en recrutant la sous-unité ribosomale 40S à l'ARNm et en régulant l'activité des autres facteurs d'initiation <sup>68</sup>. Ses deux motifs de reconnaissance de l'ARN lui permettent de lier simultanément l'ARN ribosomal 18S et l'ARNm (figure 13). eIF4B stimule l'activité ATPase de l'hélicase eIF4A <sup>39,69</sup> et joue un rôle dans le recyclage de eIF4F après recrutement de la 40S, ce qui accélère le second cycle d'initiation de la traduction <sup>70</sup>. De plus, elle lie la sous-unité eIF3a du complexe eIF3 au niveau de sa région centrale qui lui permet également de se dimériser <sup>71</sup>. Plus récemment, il a été montré que eIF4B lie la PABP <sup>72,73</sup> ce qui faciliterait le recrutement de la sous-unité 40S. Enfin l'activité de eIF4B est régulée par un jeu de phosphorylation/déphosphorylation dont on ne connaît pas encore les effets <sup>74,75</sup>. Cependant, son rôle dans l'initiation de la traduction reste encore mal connu. Ainsi, des données basées sur des systèmes reconstitués suggèrent un rôle essentiel de eIF4B pour initier la traduction <sup>76</sup> alors que l'équipe de Pestova et collègues observe une traduction efficace en son absence et suggère plus une fonction de régulation de l'initiation <sup>19</sup>.

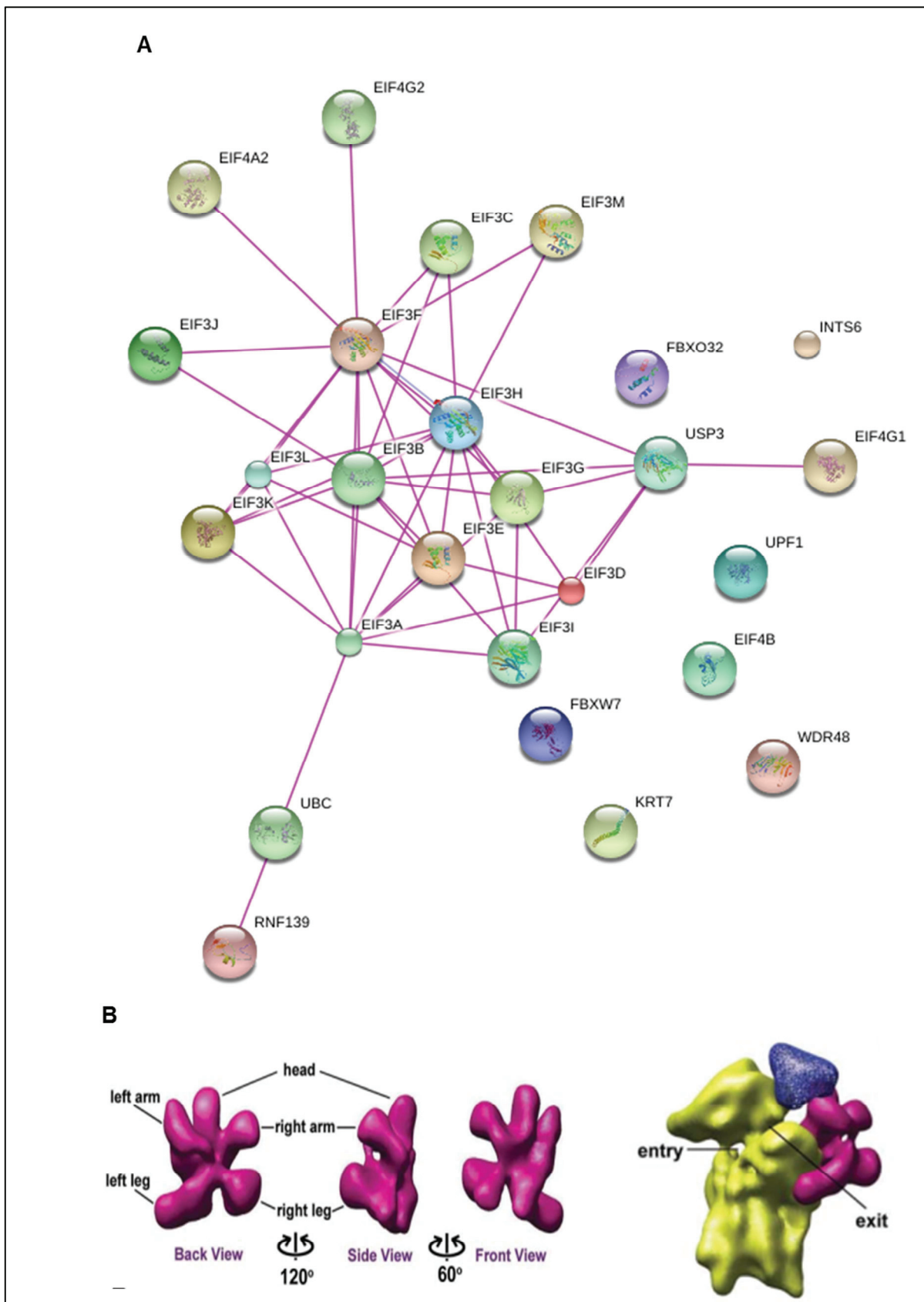


Figure 14: *Interactome et structure du complexe eIF3*

(A) Interactome de eIF3 (d'après le site internet [www.genecards.org](http://www.genecards.org)).

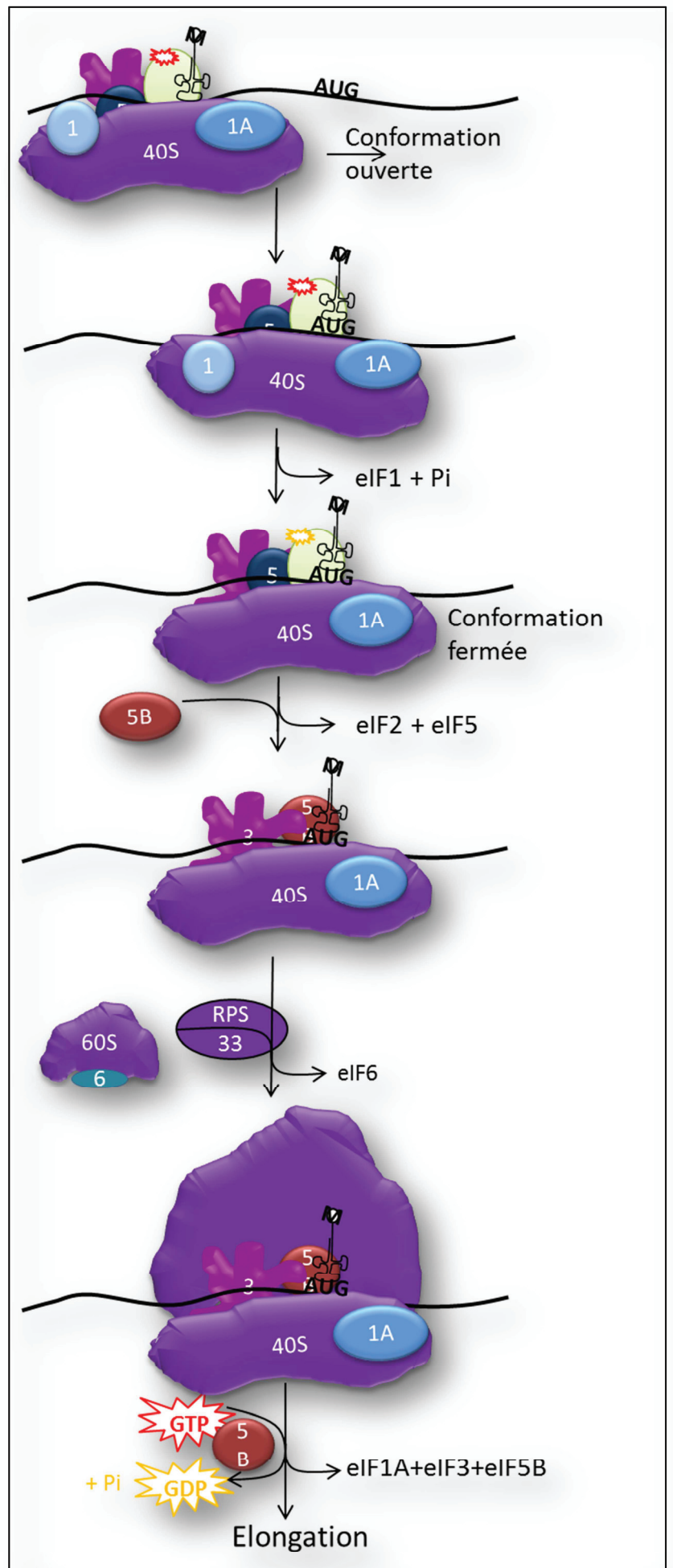
(B) Structure en cryo-EM de eIF3 et interaction avec eIF4G (bleu) et la 40S (jaune) (d'après Siridechadilok2005).

#### 4.5 Le complexe eIF3, l'étoile versatile

Le complexe eIF3 a été parmi les premiers complexes d'initiation de la traduction à être identifié dans les années 1970 mais toutes les sous-unités n'ont été clonées que récemment. Il serait présent à un ratio de 0,5 molécule par ribosome dans le lysat de réticulocyte de lapin et de une à deux molécules par ribosome en cellules Hela <sup>77</sup>. C'est l'un des facteurs le plus important pour l'initiation car il est impliqué à plusieurs niveaux de régulation. Les données récentes en cryo-microscopie électronique montrent une structure en forme d'étoile constituée d'un corps et de cinq extensions <sup>78</sup> (figure 14). Il comprend 13 sous-unités chez les Mammifères nommées de eIF3a à eIF3m alors qu'il ne contient que 6 sous-unités chez *Saccharomyces cerevisiae* qui sont homologues aux sous-unités a, b, c, g, i, et j <sup>79,80</sup> et qui constituent le cœur du complexe (excepté eIF3j) aussi bien chez les Mammifères que les levures <sup>80</sup>. Des études sur les sous-unités qui ne font pas partie du cœur montrent qu'elles ne sont pas indispensables mais jouent un rôle de régulateur dans le contrôle de l'initiation <sup>81,82</sup>. eIF3 est donc un adaptateur moléculaire dont la principale fonction est d'assurer l'interface entre les facteurs d'initiation (eIF4F, eIF2 et eIF4B) et le ribosome pour son recrutement sur l'ARNm. Les interactions entre les différentes sous-unités d'eIF3 restent encore mal connues chez les Mammifères mais ont été finement décrites chez la levure <sup>10</sup> et ce facteur d'initiation favoriserait la formation du complexe multifactoriel (MCF) mis en place avant l'arrimage du ribosome sur l'ARNm <sup>11</sup> (figure 4).

Figure 15: Du balayage de la 40S au début de l'élongation de la traduction

Les facteurs eIF1 et eIF1A induisent une conformation ouverte de la 40S qui balaie la 5'UTR jusqu'à l'AUG initiateur. Lorsque l'ARNt-initiateur entre en contact avec son codon, eIF1 catalyse le GTP porté par eIF2 ce qui induit une conformation fermée de la 40S qui se fige. eIF5B intervient alors pour permettre le relargage de eIF2 et eIF5 qui s'ensuit par le recrutement de la 60S par RPS33 (RACK1). L'hydrolyse d'un GTP par eIF5B permet la libération de eIF1A et eIF3 et l'élongation peut commencer.



#### **4.6 La sous-unité ribosomale 40S et les eIF associés, la diva**

Le complexe 48S qui résulte de l'arrimage de la petite sous-unité ribosomale 40S sur l'ARNm constitue une structure dynamique impliquant divers eIFs associés. Le corps de la 40S renferme un canal dans lequel s'engage l'ARNm et ce sont les facteurs d'initiation eIF1 et 1A qui gardent l'entrée de ce canal car ils peuvent induire une conformation fermée ou ouverte de la 40S. La conformation fermée permet la progression du PIC par balayage <sup>83</sup> et au cours de cette progression, eIF2 est partiellement hydrolysée par la GTPase eIF5 <sup>84</sup>. Cependant, le relargage du phosphate n'a lieu qu'à l'arrivée du PIC à l'AUG initiateur dont la reconnaissance semble impliquer majoritairement eIF3 <sup>85</sup>. Dès lors, le facteur eIF5B-GTP favorise l'assemblage de la grosse sous-unité 60S, l'élongation commence <sup>86</sup>. Cette dynamique au sein du 48S est de plus en plus étudiée au niveau des 33 protéines ribosomales qui constituent la 40S comme par exemple le rôle de RPS33 ou RACK1 chez les Mammifères qui assure le recrutement de eIF3 pour favoriser ainsi la formation du PIC et entraîne le relargage de eIF6 ce qui permet à la sous-unité ribosomale 60S de fixer la 40S <sup>87</sup>.

### **5 Eléments régulateurs de la traduction**

Les stimuli extracellulaires comme les facteurs de croissance, les hormones et les nutriments contrôlent la traduction à travers des voies de signalisation intracellulaires qui jouent sur l'activité et la disponibilité des facteurs d'initiation <sup>88</sup>.

Les virus ont développé de nombreuses stratégies pour contourner ces voies de signalisation intracellulaires notamment par la présence de structures *cis*-régulatrices qui peuvent les affranchir de tout, ou partie, des facteurs d'initiation de la traduction. La diversité des mécanismes viraux de détournement de la traduction est bien illustrée dans la revue de Walsh et Mohr <sup>89</sup>.



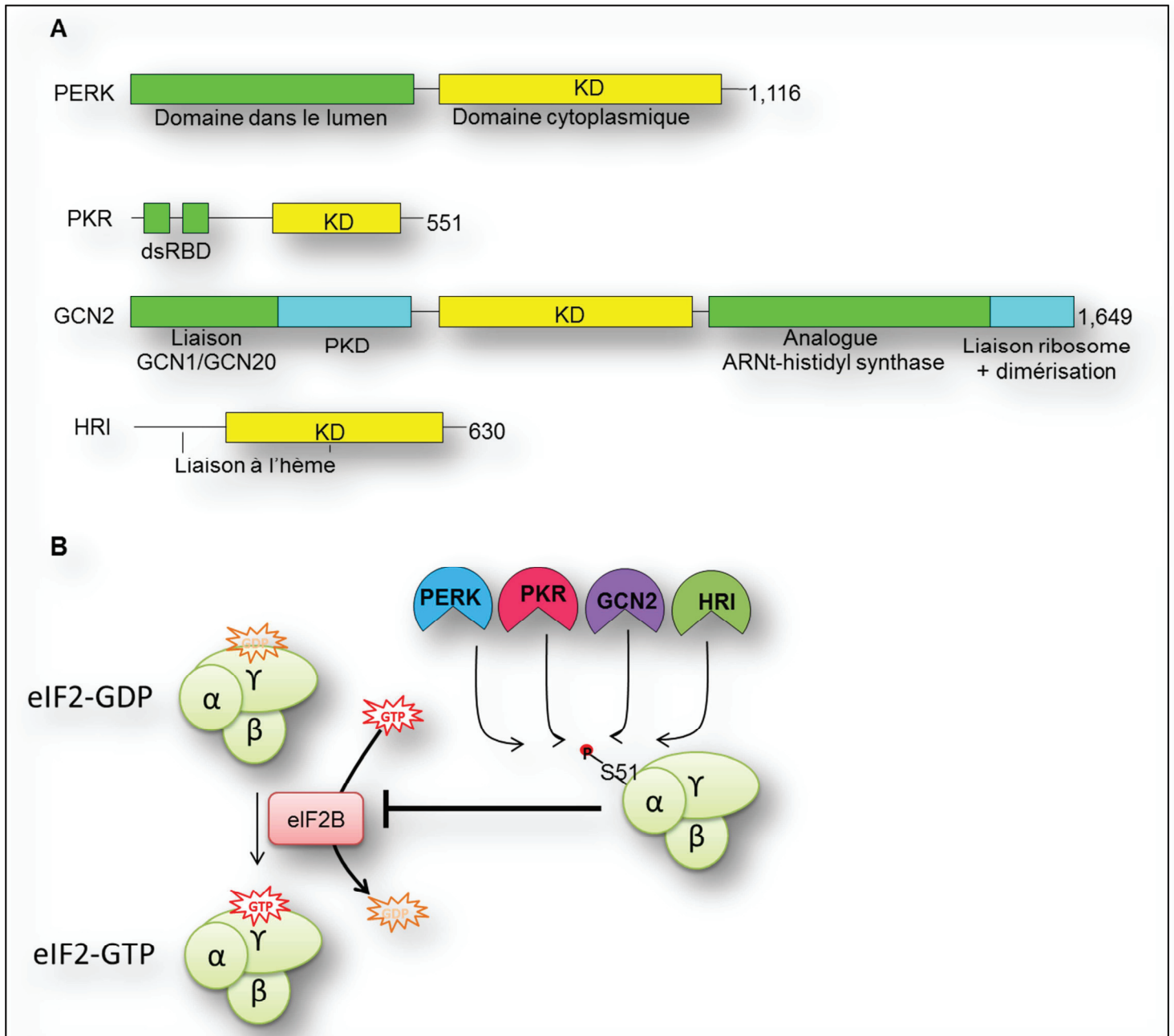


Figure 16: les kinases d'eIF2 $\alpha$  (adapté de Donnelly2013<sup>90</sup>)

- (A) Carte des motifs des différentes kinases d'eIF2 $\alpha$  qui possèdent toutes un domaine kinase (jaune) et des domaines qui concourent à leur fonction (vert) comme le domaine de reconnaissance de l'ARN double brin de PKR (dsRBD). Les autres domaines sont en bleu.
- (B) Les kinases phosphorylent eIF2 $\alpha$  au niveau de la sérine 51, ce qui l'empêche le recyclage du GTP et la formation du complexe ternaire (figure 4).

## 5.1 Régulation en *trans*

La régulation en *trans* de la synthèse des protéines s'effectue au niveau de la disponibilité et l'intégrité des différents facteurs ainsi que leur état de phosphorylation qui régule leur activité.

### 5.1.1 Les kinases d'eIF2 $\alpha$

Quatre kinases d'eIF2 $\alpha$  ont été caractérisées et interviennent au cours de différents stress cellulaires (figure 16). PKR (protéine kinase R) est une kinase inducible par la voie interféron qui est activée par la présence d'ARN double brin (ARNdb) et se dimérise à son contact, PERK (protéine kinase du réticulum endoplasmique - PKR like ER kinase) est régulée par l'accumulation de protéines incorrectement repliées dans le réticulum endoplasmique, GCN2 (general control non-derepressible-2) est impliquée dans la réponse à une carence en acides aminés ou suite à une irradiation aux UV et enfin HRI (Heme-regulated inhibitor) est une enzyme qui est activée lors d'une carence en fer dans les précurseurs d'érythrocytes et joue également un rôle dans l'inhibition du protéasome. Ces quatre kinases peuvent phosphoryler la sous-unité  $\alpha$  de eIF2 au niveau de la serine 51 ce qui empêche le recyclage du GDP en GTP entraînant l'arrêt de la traduction cellulaire et, dans de nombreux cas, la traduction virale. En parallèle de la diminution générale de la traduction, la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  peut entraîner une expression de gènes en cascade qui constituent la réponse intégrée au stress (ISR) qui est une voie de restauration de l'homéostasie cellulaire, ou peut faciliter l'apoptose selon le contexte cellulaire. Les fonctions des kinases d'eIF2 $\alpha$  sont développées très en détail dans la revue de Donnelly et collègues <sup>90</sup>.

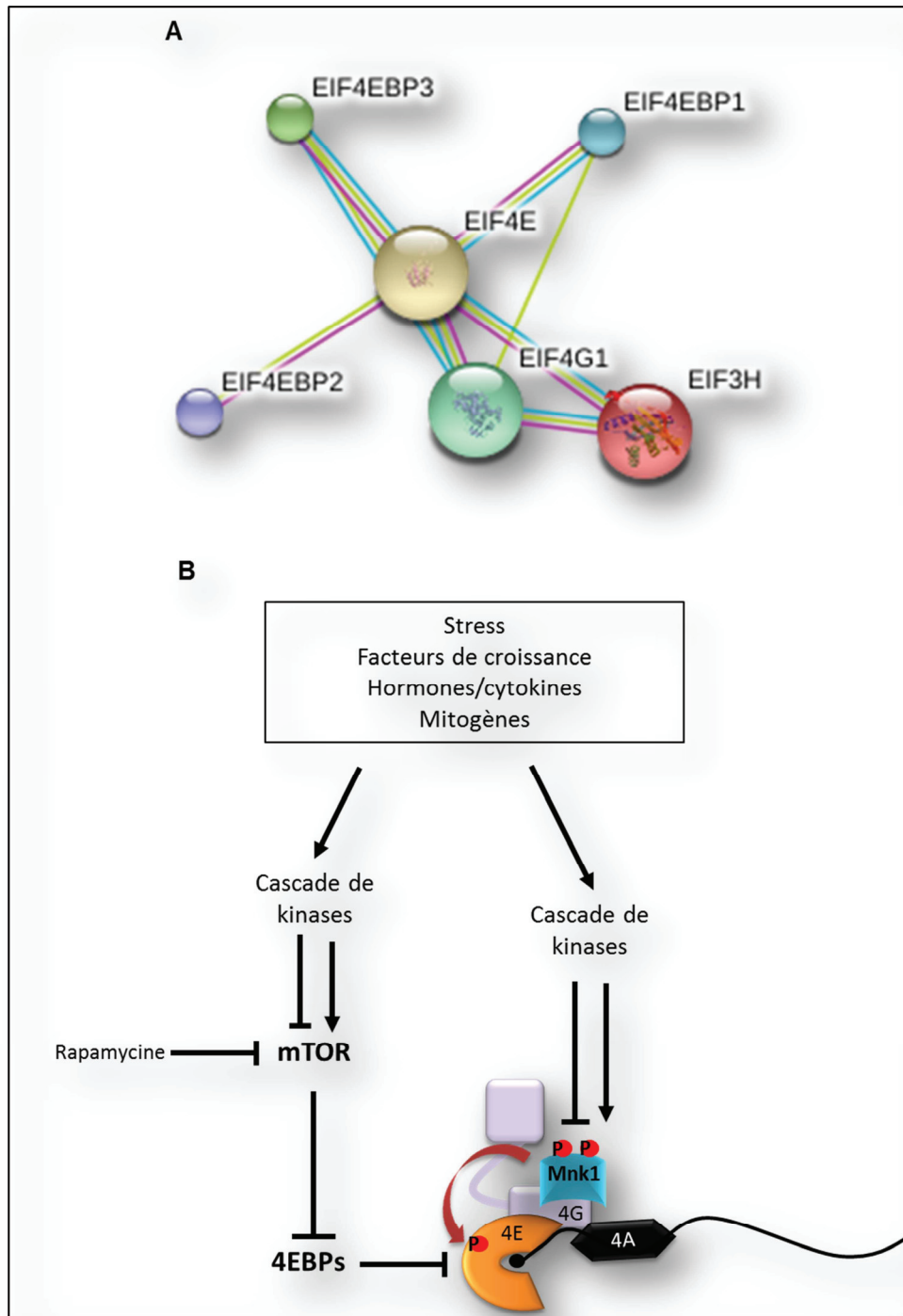


Figure 17 : *Inhibition de eIF4E*

(A) Interactome de eIF4E (d'après le site internet [www.genecards.org](http://www.genecards.org)).

(B) Cascades de phosphorylations qui régulent l'activité de eIF4E en agissant sur MNK1 et les 4EBPs.

De nombreuses stratégies virales permettent de contourner l'activation de ces kinases et en particulier PKR qui est activée lors de l'infection virale. Ainsi, le virus d'Eipstein-barr (EBV) code pour un ARNdb (EBERs) qui s'associe à PKR sans l'activer <sup>89</sup>. D'autres virus comme le virus de l'hépatite C (HCV) <sup>91</sup> et le virus de paralysie du criquet (CrPV) <sup>92</sup> bénéficient de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  pour stimuler la production de leurs propres protéines car ils sont moins, ou pas, affectés par la phosphorylation de eIF2 $\alpha$ .

### 5.1.2 La régulation de l'activité de eIF4E

L'affinité de eIF4E pour la coiffe des ARNm est dépendante de son état de phosphorylation <sup>93</sup> qui est régulé par la kinase Mnk1 (figure 17). Cette dernière serait recrutée à proximité eIF4E grâce à une interaction mnk1-eIF4G <sup>94</sup>. De plus, la disponibilité de eIF4E est contrôlée par trois protéines de liaison appelées 4EBPs chez les Mammifères <sup>35</sup>. Lorsque les 4EBPs sont hypophosphorylées, elles s'associent efficacement à eIF4E et empêchent l'interaction eIF4E-eIF4G ainsi que sa phosphorylation par Mnk1 ce qui conduit à l'inhibition de la traduction coiffe dépendante <sup>95</sup> (figure 17). Ce jeu de régulation 4EBP dépendant intervient particulièrement lors des différentes phases du cycle cellulaire quand l'initiation coiffe dépendante est inhibée en phase G2 et lors de la mitose <sup>96</sup>. La levée de l'inhibition fait intervenir la voie de signalisation cible de la rapamycine (mTOR) qui bloque la formation de complexes eIF4E-4EBP par la phosphorylation de 4EBP sur plusieurs sites <sup>97</sup>. La régulation du taux de 4EBP lors du développement embryonnaire souligne l'importance d'eIF4E dans le contrôle traductionnel <sup>98</sup>.

Outre des structures *cis*-régulatrices présentes sur les ARNm (voir les IRES plus loin) qui permettent d'outrepasser une régulation de la traduction coiffe dépendante et donc de la régulation par les 4EBPs, les virus ont développé de



nombreuses stratégies pour contourner cette voie de régulation comme EBV qui phosphoryle 4EBP1 en utilisant la voie des kinases activatrices de mTOR. A l'inverse, 4EBP1 est phosphorylée par le poliovirus (PV) et le virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) ce qui leur permet de détourner la machinerie traductionnelle à leur profit <sup>99</sup>.

### **5.1.3 Autres facteurs stimulateurs de la traduction**

En plus des facteurs canoniques d'initiation de la traduction, on trouve divers éléments régulateurs qui peuvent stimuler la synthèse de protéines en agissant à différents niveaux. Ainsi, la protéine d'interaction à la PABP 1 (PAIP1), un homologue de eIF4G, stimule la traduction <sup>100</sup> par un mécanisme qui reste mal connu mais qui pourrait permettre le meilleur recrutement d'eIF4F par une interaction PAIP1-PABP-eIF4G. Plus récemment, il a été montré que PAIP1 interagit directement avec eIF3 ce qui pourrait aussi expliquer l'activité stimulatrice médiée par le complexe PAIP1-eIF3-eIF4G <sup>101</sup>; il semble donc que cet effet se situe au niveau de l'arrimage du ribosome par une optimisation de la mise en place des facteurs d'initiation de la traduction.

Récemment, notre équipe a montré que des hélicases additionnelles peuvent intervenir dans la stimulation de la traduction. Ainsi la protéine à domaine DEAD box, DDX3, qui ne peut pas se substituer à l'hélicase canonique eIF4A, est indispensable à la traduction de gènes dont l'expression est dirigée par la 5'UTR du HIV1 <sup>20</sup>. La protéine DDX3 aurait un rôle dans l'arrimage du ribosome en interagissant avec eIF4G et PABP mais aussi dans le balayage de la petite sous-unité ribosomale le long des régions 5'UTR qui contiennent une tige boucle stable immédiatement en 5' de l'ARNm <sup>20</sup>.

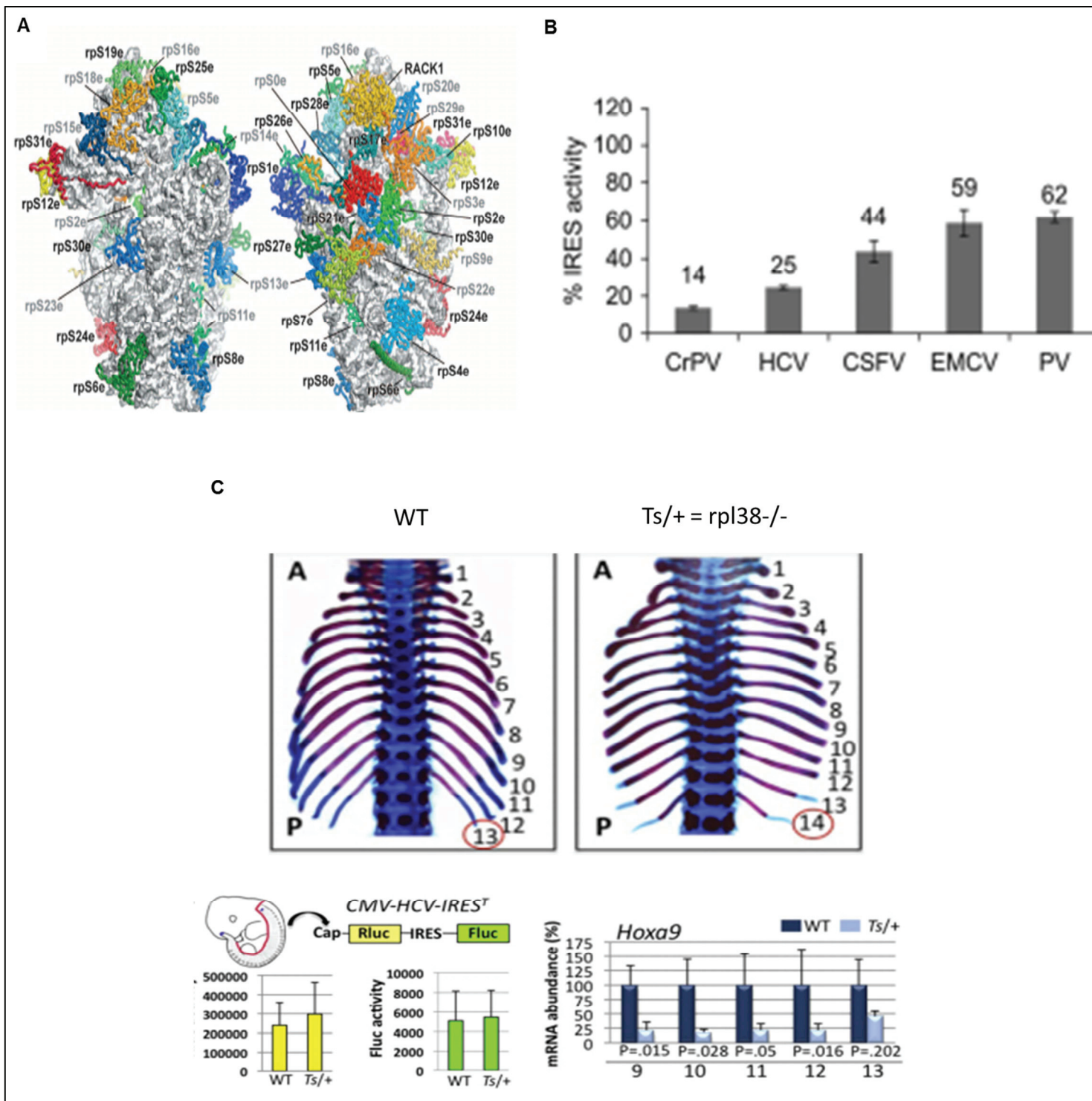


Figure 18: Les ribosomes spécialisés

- (A) Structure de la petite sous-unité ribosomale eucaryote avec l'ARNr 18S (en gris) et les 33 protéines ribosomales (en couleur) (D'après Rabl 2011 <sup>102</sup>).
- (B) Perte de l'activité IRES de différents virus après extinction du gène codant pour RPS25 (d'après Hertz 2013 <sup>103</sup>).
- (C) Perte de l'expression des gènes Hox après extinction de gène codant pour RPL38 (d'après Kondrashov 2011 <sup>103</sup>).



#### 5.1.4 Le ribosome spécialisé

Le ribosome est un complexe ribonucléoprotéique constitué de deux sous-unités : la petite sous-unité 40S qui se compose de 33 protéines (RPS) et de l'ARN ribosomale 18S (ARNr 18S) (figure 18) et la grosse sous-unité 60S constituée de 49 protéines (RPL) et des ARNr 5S, 28S et 5,8S. Des données récentes suggèrent que le ribosome a une composition dynamique ce qui permet d'entrevoir la possibilité de ribosomes spécialisés dans la traduction de différents ARNm. Ainsi, il a été montré que la protéine RPS25 est indispensable à la traduction des ARNm viraux possédant des séquences d'entrée interne du ribosome (IRES) alors que l'inhibition de cette protéine par ARN interférence en cellule n'affecte pas la traduction d'ARNm coiffe dépendant <sup>104,105</sup> (figure 18). De même, l'oncogène v-erbA qui induit la transformation des lignées pro-érythrocytaires aviaires, conduit à la formation d'une sous-population de ribosomes dépourvus de la protéine RPL11, ces ribosomes traduiraient mieux l'ARNm codant pour la protéine HSP70 <sup>106</sup>. Enfin, lors du développement des organismes complexes, des gènes architectes appelés gènes Hox jouent un rôle crucial dans la structuration de l'organisme. L'étude d'embryon de souris qui n'expriment plus la protéine RPL38 montre un défaut homéotique qui serait dû à un défaut de traduction des ARNm codant spécifiquement pour certains gènes Hox <sup>103</sup> (figure 18).



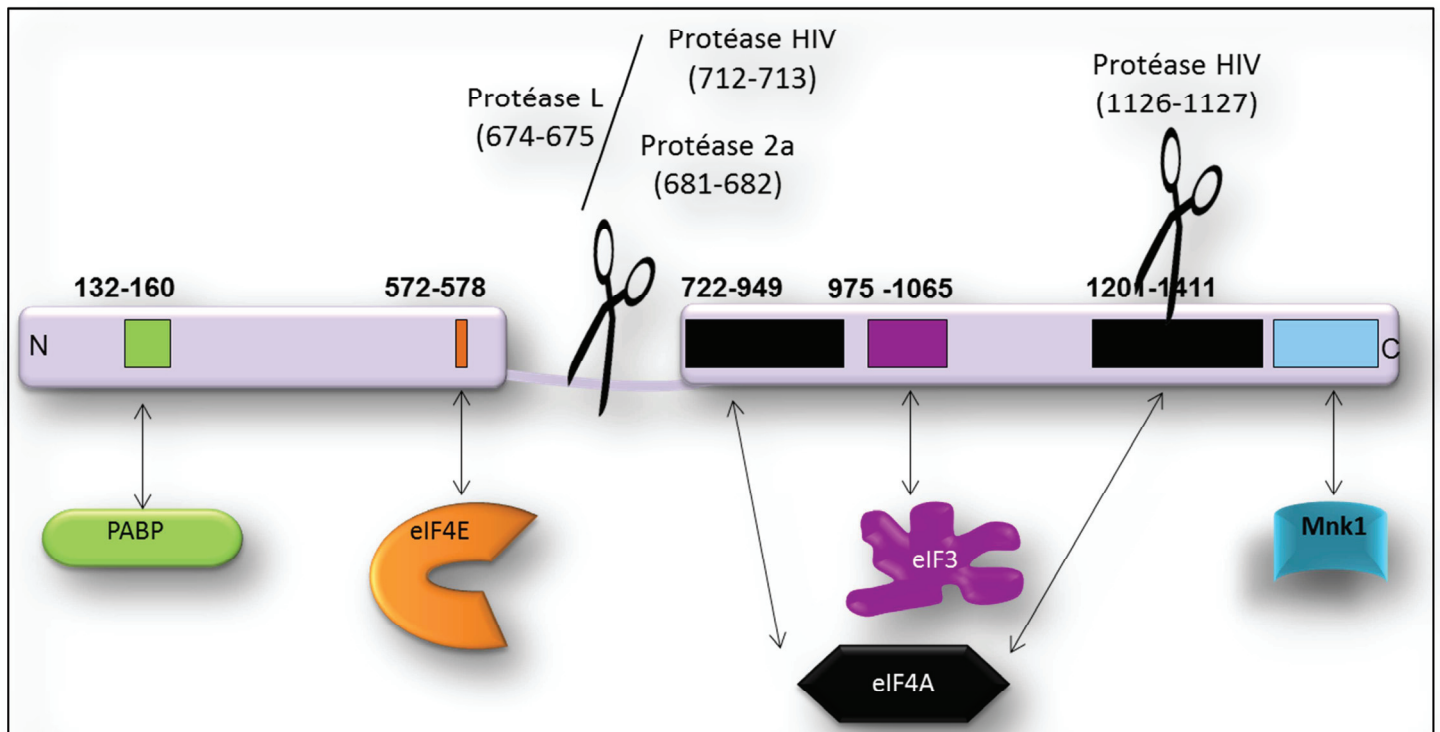


Figure 19: *Site de clivage de eIF4G*

Site de clivage de eIF4G par la protéase L du FMDV, la protéase 2a du PV et la protéase de HIV.

### 5.1.5 Des protéases virales : cliver pour mieux régner

L'initiation de la traduction est l'étape ciblée préférentiellement par les nombreuses protéines virales qui modifient, ou clivent, certains des facteurs d'initiation que nous avons décrit précédemment. Ainsi, la coiffe qui permet de recruter le complexe eIF4F est la cible des Poxvirus qui expriment des enzymes capables de décoiffer les ARNm cellulaires <sup>107</sup> rendant ainsi eIF4F disponible exclusivement pour les ARNm viraux. Les protéases 2A des entérovirus ou la protéase Leader (protéase L) du virus de la fièvre aphteuse (FMDV) clivent chacune eIF4G à deux endroits distincts, séparés de 7 acides aminés, ce qui sépare le domaine de liaison à eIF4E du domaine liant eIF4A-eIF3-ribosome mais n'empêche par l'expression des ARNm viraux qui ont une traduction coiffe indépendante <sup>108</sup> (figure19). La protéine PABP est également une cible privilégiée des virus et est clivée par les protéases des lentivirus, entérovirus et calicivirus bien que son inactivation ne soit pas toujours corrélée au shut-off cellulaire <sup>108</sup>. Par exemple, la protéase 3C des rhinovirus clive PABP <sup>108</sup> et clive également d'autres facteurs qui jouent un rôle dans la synthèse des protéines comme eIF5B, eEF1A et eEF2. Le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) clive également eIF4G en deux endroits (figure 19) ainsi que la PABPI <sup>46,47</sup>. Cette stratégie virale de cliver pour mieux régner est souvent associée à des séquences *cis*-régulatrices portées par les ARNm viraux qui permet aux virus de recruter la sous-unité 40S en absence de tout ou partie des facteurs d'initiation et qui peuvent donc s'approprier en exclusivité l'ensemble de la machinerie traductionnelle.

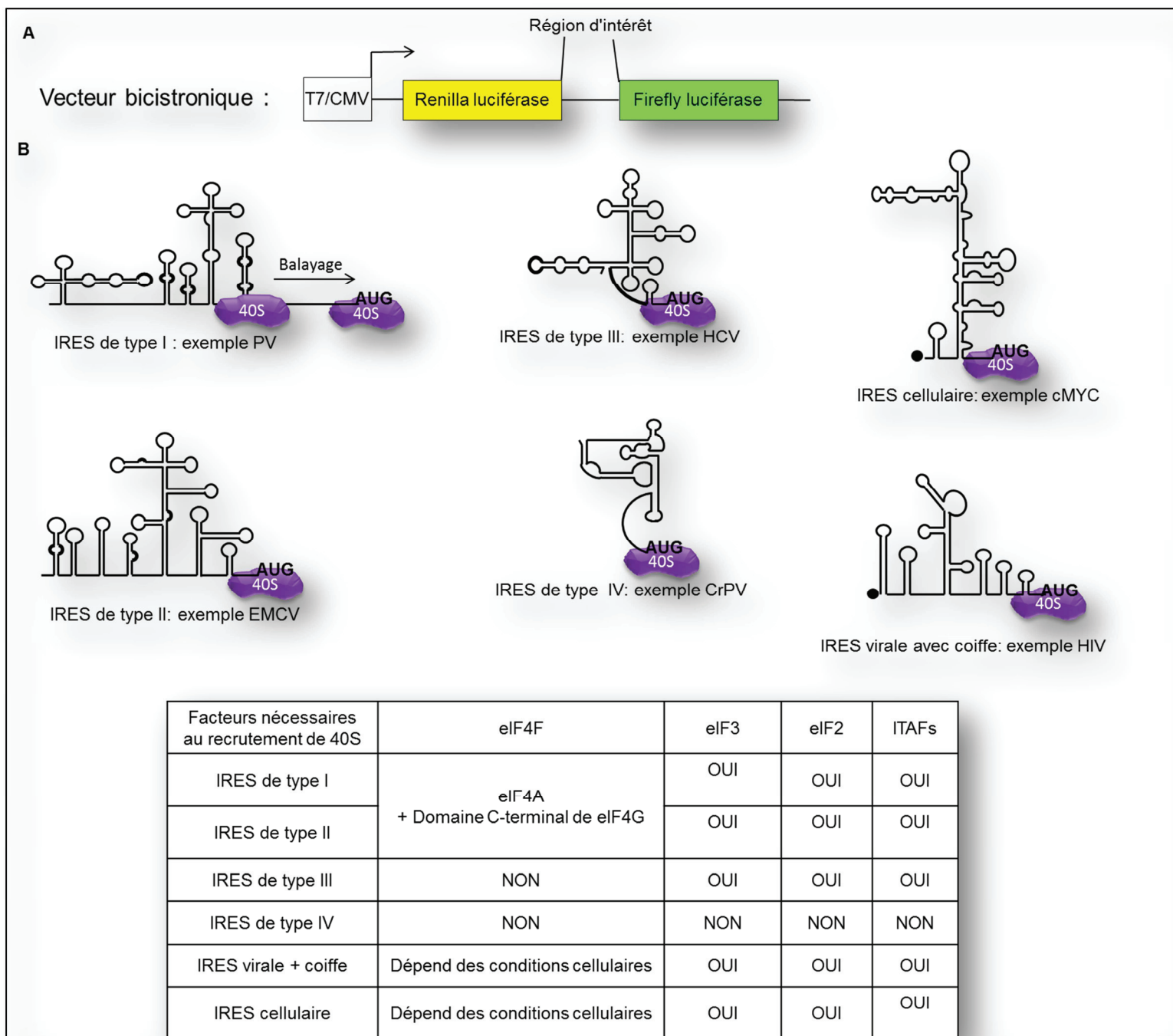


Figure 20: *Méthode d'étude et diversité des IRES*

(A) Composition d'un vecteur bicistronique permettant d'identifier une région IRES.

(B) Structure secondaire de quelques IRES modèles et les facteurs d'initiations requis (tableau).

## 5.2 Régulation en *cis*

### 5.2.1 Les IRES

Les séquences d'entrée interne des ribosomes, IRES, plus souvent présentes dans les 5'UTR structurées des ARNm, permettent de recruter les ribosomes de façon coiffe indépendante. Ce mode de traduction serait utilisé par environ 10% des ARNm cellulaires dont la traduction est maintenue dans des conditions d'inhibition de la traduction coiffe dépendante comme c'est le cas durant la mitose ou l'apoptose <sup>109</sup>. Les ARNm cellulaires qui possèdent une IRES codent souvent pour des protéines essentielles à la croissance cellulaire et l'angiogenèse comme les proto-oncogènes c-myc <sup>110,111</sup> ou HSP70 <sup>112</sup> et sont donc une voie d'étude clé dans la compréhension et la lutte des processus intervenant dans les cancers.

Historiquement, les IRES ont été initialement caractérisées chez les virus. Des études sur les 5'UTR des virus PV et EMCV ont montré qu'elles ne sont pas compatibles avec une traduction coiffe dépendante classique <sup>113,114</sup>. Ces 5'UTR ne possèdent pas de coiffe <sup>115</sup>, elles sont longues et contiennent de multiples AUGs en amont de la phase de lecture principale. Malgré toutes ces caractéristiques, ces 5'UTRs permettent le recrutement de manière efficace de la petite sous-unité ribosomale. Historiquement, et encore aujourd'hui, pour déterminer l'activité IRES d'un segment d'ARN, le test le plus répandu consiste à créer un ARN messager dit bicistronique en insérant la région d'intérêt à tester entre deux gènes rapporteurs situés sur la même unité transcriptionnelle (figure 20). L'ARN messager produit contient alors deux cadres ouverts de lecture (ORF), le premier est traduit par un mécanisme coiffe dépendant, tandis que le second ne peut être traduit que si la région insérée renferme un site d'entrée interne des ribosomes. D'autres tests qui avaient été mis au point, comme par exemple la synthèse d'ARN circulaire, ont été



progressivement abandonnés au profit du test de l'ARN messenger bicistronique<sup>114,116</sup>.

Une classification non officielle regroupe les IRES virales en 4 familles. Elle est établie selon l'utilisation des facteurs d'initiations requis et détaillée dans la revue de Balvay et collègues<sup>116</sup> (figure 20). Les IRES de type I et II identifiées chez les Picornavirus n'ont pas besoin d'eIF4E pour traduire à l'exception du virus de l'hépatite A (HAV) qui nécessite le complexe eIF4F complet. Les IRES virales de type I des entérovirus comme celle du PV vont être balayées par la 40S alors que les IRES du cardiovirus EMCV et de l'aphtovirus FMDV qui appartiennent à la famille des IRES de type II recrutent directement la 40S sur le codon initiateur<sup>116</sup>. Les IRES de type III ont été définis pour les ARNm des flaviridés comme le virus de l'hépatite C (HCV) et certains picorna-like virus comme le virus de l'encéphalomyélite aviaire (AEV) qui n'ont pas besoin d'eIF4F et recrutent directement le PIC grâce à une interaction entre eIF3 et l'ARN<sup>117</sup>. Enfin les IRES de type IV retrouvées dans la famille des Dicistroviridés comme le virus de paralysie du criquet (CrPV) n'ont besoin d'aucun facteur d'initiation de la traduction et sont capables de recruter directement la petite sous-unité ribosomale 40S en absence de eIF2 et du Met-ARNt<sup>met</sup> initiateur<sup>118</sup>. Les ARNm des lentivirus qui contiennent à la fois une coiffe et une IRES<sup>116,119</sup> ne font pas partie de ce classement et seraient plus proche fonctionnellement des IRES cellulaires qui peuvent alternativement recruter la petite sous-unité ribosomale par un mécanisme coiffe dépendant ou initier la traduction par l'entrée interne des ribosomes.

### 5.2.2 Régulation de l'activité IRES

L'activité d'une IRES varie énormément entre les différentes lignées cellulaires. Ainsi, l'IRES du PV traduit faiblement en cellules BHK mais est beaucoup



plus active en cellule Hela <sup>120</sup>. De même, l'efficacité traductionnelle de l'IRES c-myc est vingt fois supérieure en cellule Hela par rapport aux cellules MCF7 <sup>121</sup>. Ces différences de traduction entre les cellules s'expliqueraient par la présence ou absence de facteurs agissant en *trans* des IRES nommés ITAFs pour IRES *trans-acting factors* <sup>113,114</sup>. Dans ce sens une étude protéomique a permis d'identifier plusieurs protéines cellulaires qui interagissent avec l'IRES en 5' de l'ARNm du HIV1 et seraient de bons candidats en tant qu'ITAFs spécifiques à la synthèse des protéines du virus <sup>122</sup>. L'ITAF le plus étudié est la protéine de liaison à l'ARN PTB impliquée dans la traduction mais également dans l'épissage, la stabilité et la localisation des ARNm <sup>123</sup> et citons également la protéine GRSF1 qui stimule l'activité IRES de c-myc <sup>124</sup>. Ces ITAFs joueraient un rôle au niveau de la structuration de l'IRES (activité chaperonnes) et favoriseraient également le recrutement du ribosome <sup>125</sup>. Les ITAFs soulèvent un point important dans l'étude de la traduction car ils constituent un des arguments selon lequel la traduction d'un ARNm est régulée au niveau d'un RNPM et non pas sur un ARNm nu.





## VI

### Traitement

Si, par l'hygiène, on peut prévenir l'attaque de l'influenza, l'attaque aiguë; il n'existe pas par contre de médication sérieusement abortive. La première précaution à conseiller est de faire rester le malade à la chambre, sinon au lit, malgré ses protestations et, en tout cas, de le garantir contre le froid. L'air pur et chaud est déjà un puissant remède. Aux riches, j'ordonne volontiers d'aller sous un ciel plus doux, vivre en plein air, aux déshérités, de se mettre au soleil, s'il y en a; s'il en entre dans l'appartement; puis le traitement doit varier selon les trois cas de *grippe nerveuse*, de *grippe gastro-intestinale* et de *grippe pulmonaire*.

**Grippe pulmonaire.** — 1° Sinapismes ou ventouses en cas de suffocation;

2° Prendre quatre cuillerées à soupe par jour de :

Benzoate de soude.....	13 grammes
Sirop de Tolu.....	80 —
Sirop Diacode.....	50 —

Faire plusieurs fois dans la journée des inhalations de menthol ou des pulvérisations avec :

Teinture d'iode.....	deux grammes ou 45 gouttes
Eau chaude.....	100 grammes

Cette eau iodée ou du menthol arrêtent immédiatement les irritations du larynx, de la gorge et du nez.

Si l'on se trouvait à la campagne et que l'on ne possédât rien du ci-dessus arsenal de thérapeutique, on s'exposerait à la vapeur d'essence de térébenthine, dont la valeur d'un dé à coudre serait placée sur une cuvette ou sur une assiette chauffée au bain-marie.

Figure 21: Remèdes contre grippe au début des années 1900

Publicité pour le Picon et extrait du livre du Docteur Labonne « comment on se défend de l'Influenza ».

# Chapitre II : les virus de l'Influenza A

## responsables de la grippe

### 1 Généralités

#### 1.1 Historique et étymologie du virus

La grippe est une infection respiratoire qui a marqué l'humanité et constitue aujourd'hui encore une des maladies infectieuses des plus répandues. Il est cependant toujours difficile d'associer une épidémie de grippe à un fait historique car de nombreuses maladies telles que la diphtérie, le choléra ou le typhus peuvent se manifester par des symptômes grippaux (André G. 1908). Avant de définir clairement la grippe, celle-ci était regroupée dans les maladies catarrhales ou catarrhe qui est une inflammation aiguë ou chronique des muqueuses. Elle prendra par la suite le nom de coqueluche, tac voire folette, coquette ou même petit courrier (André G. 1908). L'origine du terme grippe reste flou, il viendrait de l'allemand *grippen* qui signifie attraper ou alors de la ville de Reims selon Landouzy avec l'expression rémoise vulgaire agripper (André G. 1908). Le terme Influenza viendrait de l'italien *Influenza di freddo* ou *Influenza di stelle* (sous l'influence du froid ou des astres) faisant référence au caractère saisonnier de la maladie<sup>126</sup>.

Hippocrate décrit en 412 av JC, une maladie dont les symptômes sont proches de ceux de la grippe (André G. 1908). Nommée la toux de Périnthe, du nom de la ville proche de l'actuelle Istanbul en Turquie, cette maladie serait la première épidémie grippale décrite en Europe. En 212 av JC, Livy relate une épidémie ayant décimé l'armée romaine que les historiens attribuent aujourd'hui à la grippe.



A



B

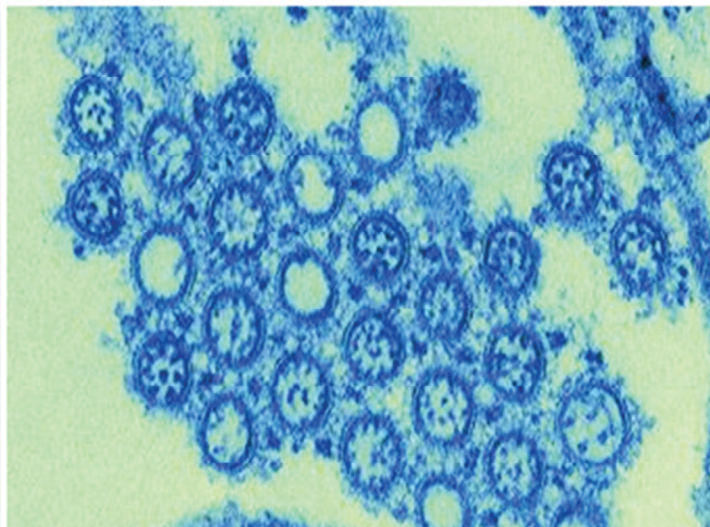


Figure 22: Les découvertes du pathogène de la grippe

- (A) Isolement de *Heamophilus Influenza* en couverture d'un journal et son découvreur, le Dr. Pfeiffer à droite.
- (B) Microscopie électronique du virus de l'Influenza A et son découvreur, le Dr. Shope.

Un catarrhe d'origine grippale aurait décimé la population de Montpellier en 1387. En 1510, l'Europe est traversée d'est en ouest par une épidémie de grippe et une première description clinique fait état de pneumonies (Thompson T. 1852). La première description d'une pandémie grippale date de 1580 et elle s'étendit de l'Asie à l'Europe et à l'Afrique (André G. 1908). En cinq siècles, une quarantaine d'épidémies de grippe et une dizaine de pandémies ont été recensées.

## 1.2 Etiologie de la grippe

Willis en 1657 et Sydenham en 1675 (André G. 1908) décrivent avec précision les symptômes grippaux : fièvre et maux de tête, infection de l'oreille moyenne, gorge irritée, problèmes respiratoires, douleur dans les sinus, les muscles et les articulations, le tout associé à une forte fatigue.

Au XIX<sup>ème</sup> siècle on s'interroge sur le vecteur de la maladie. En 1883, Seifert isole des microcoques gram <sup>+</sup> à partir de mucus nasal et bronchique de patients atteints de grippe, puis en 1892, Pfeiffer isole *Bacillus Influenzae* à partir de crachats, sucs pulmonaires, séreuses et plèvres de patients infectés (figure 22). Ce bacille sera renommé par la suite *Haemophilus Influenzae* mais l'hypothèse d'un agent bactérien ne fait toutefois pas l'unanimité. Début 1900, avec la découverte du virus responsable de la fièvre jaune, certains chercheurs pensent qu'un autre virus filtrant serait la cause de la grippe. Dès 1918, le chercheur Dujarric de la Rivière présente à l'académie des sciences ses résultats démontrant que l'agent étiologique de la grippe est une particule ultrafiltrable, un virus et montre qu'en s'inoculant par voies sous-cutanée un filtrat de sécrétions respiratoires de patients atteints de la grippe, il présente alors les symptômes d'une grippe. S'il procédait à une seconde inoculation du même filtrat, il devenait résistant ; il s'était vacciné.

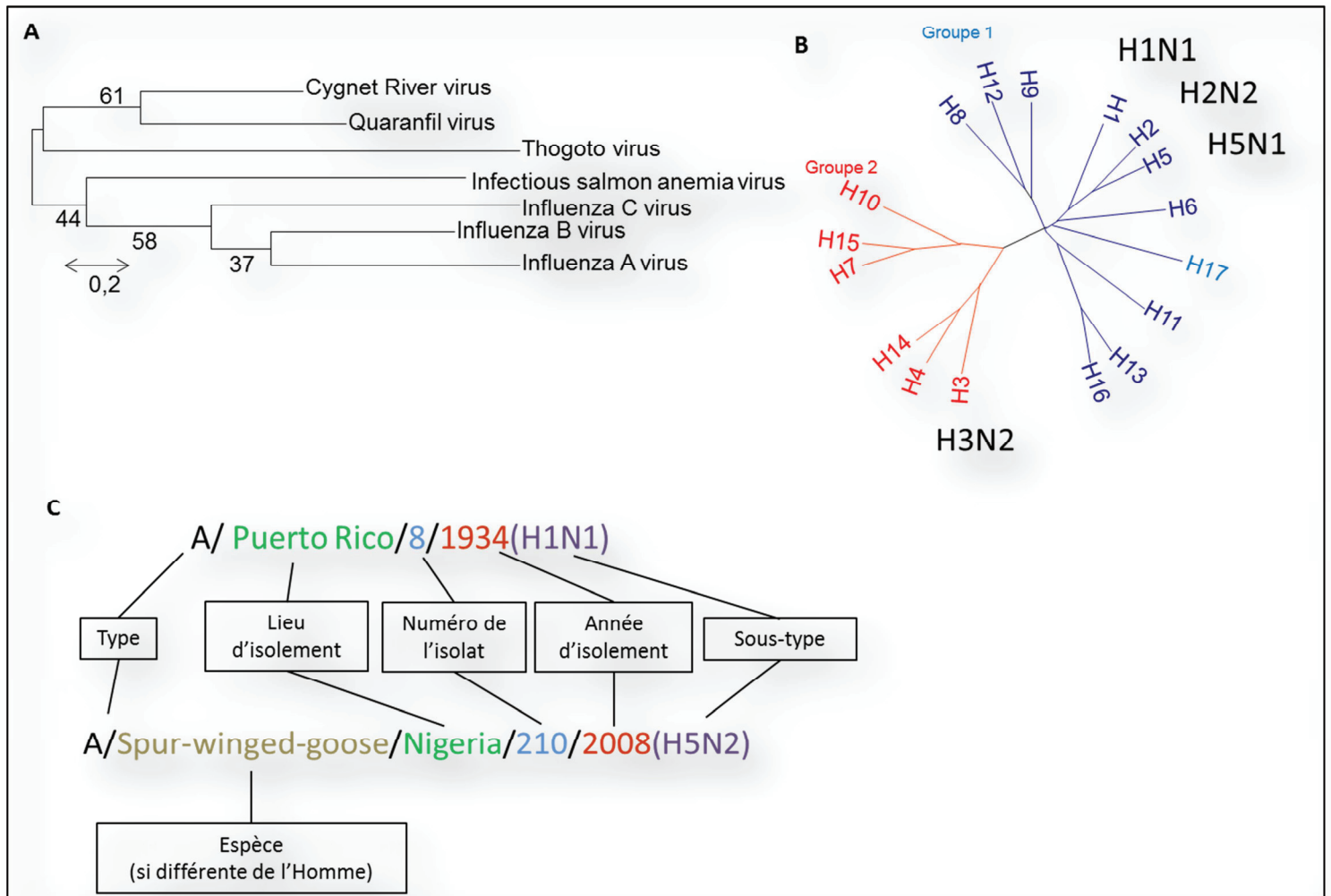


Figure 23: *Phylogénie et nomenclature du virus*

- (A) Phylogénie des Orthomyxoviridés.
- (B) Phylogénie des virus de l'Influenza A basée sur le gène codant pour l'hémagglutinine (HA) et position des différents sous-types qui peuvent infecter l'Homme (en noir).
- (C) Nomenclature des différentes souches d'Influenza A.

Il faudra attendre 1931 pour que Shope isole le premier un virus grippal chez le porc <sup>127</sup> (figure 22), puis Smith, Andrewes et Laidlaw chez l'homme en 1933 <sup>128</sup>. L'équipe de chercheur travaillait initialement sur un vaccin contre la maladie de Carré sur le furet à une époque où une épidémie de grippe humaine touchait également les furets. En 1940, Magill et Francis isolèrent un second type de virus Influenza, nommé Influenza B pour le différencier de l'Influenza A. En 1950, Taylor isole un troisième type, appelé Influenza C.

### 1.3 Classification et nomenclature

Les virus de la grippe appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae*, caractérisés par des virus enveloppés qui possèdent une information génétique fragmentée sous forme d'ARN simple brin et de polarité négative. Il existe trois types A, B, C qui se distinguent par leur organisation génomique globale et les propriétés antigéniques de la nucléoprotéine (NP) et de la protéine de matrice (M1) (Fields 2005) (figure 23). Bien que les types B et C infectent l'Homme, les impacts sanitaires et sociaux sont moins importants que pour le type A (Fields 2005).

Cette thèse se focalise essentiellement sur les Influenza A dont l'hôte naturel est la poule d'eau mais qui peut infecter d'autres espèces aviaires ainsi que des Mammifères dont l'Homme <sup>129</sup>. Les virus de l'Influenza A sont classés en sous-types qui dépendent des caractéristiques antigéniques des deux glycoprotéines de surface : l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA). Il existe actuellement 17 HA et 10 NA <sup>130,131</sup> décrits et forment des combinaisons qui ne sont pas toutes viables <sup>126</sup>. Seules les combinaisons H1, H2, H3 et N1, N2 circulent chez l'Homme <sup>126</sup>. La nomenclature utilisée pour distinguer les différentes souches fait intervenir le type, l'hôte si celui-ci n'est pas humain, le lieu, le numéro et l'année d'isolement. Ainsi, les souches A/Wisconsin/1933(H1N1) ou WSN et A/Puerto Rico/8/1934(H1N1)



ou PR8 sont les modèles d'étude du virus fréquemment utilisés en recherche fondamentale et également pour la production de vaccin <sup>126</sup>. Au cours de ma thèse, j'ai travaillé sur ces souches ainsi que sur la souche A/moscow/1999(H3N2) qui a été une souche circulante au début des années 2000.

#### **1.4 Des virus redoutables...**

Les virus de l'Influenza A sont à l'origine de trois pandémies graves au cours du XXème siècle. La pandémie de 1918-1920 ou grippe espagnole s'est répandue dans le monde entier en trois vagues successives <sup>127</sup>. Son origine est mal connue mais elle pourrait venir de Chine bien que les premiers malades aient été diagnostiqués aux Etats-Unis <sup>127</sup>. La première vague qui a frappé au cours du printemps 1918 n'était pas particulièrement meurtrière mais très contagieuse alors que la seconde vague qui débuta en septembre fût très virulente (Cadbury W. 1919). Des complications bactériennes rendirent le virus hautement pathogène. La pneumonie virale primaire pouvait tuer une personne saine en deux jours. Un point surprenant fût le profil de mortalité de ce virus. Alors qu'habituellement les grippes saisonnières sont mortelles pour les individus faibles comme les personnes âgées et les enfants en bas âge, la grippe espagnole affectait plus particulièrement des adultes entre 20 et 40 ans. Cette pandémie fit entre 20 et 50 millions de morts selon les estimations <sup>132</sup> et aurait touché environ la moitié de la population mondiale alors estimée à 1,9 milliards d'individus <sup>132</sup>. Récemment, le génome de ce virus a été séquencé en partie lors d'une mission d'exploration suédoise en Sibérie et sa nomenclature est A /brevig mission/1918 (H1N1).

En 1957, un virus H2N2 se propage de la province de Yunnan en Chine puis dans toute l'Asie et s'étend rapidement à toute la surface de la planète faisant entre 1 et 4 millions de morts dont beaucoup décèdent suite à une pneumonie <sup>133</sup>. On





parlera par la suite de grippe asiatique. La dernière pandémie du XXème siècle est causée par la grippe de Hong Kong, dont le nom provient de son point de départ, en 1968. Ce virus H3N2 causa plus de pertes humaines lors d'une deuxième vague d'infection durant l'hiver 1969 et fut responsable de 1 à 2 millions de morts dans le monde.

## **1.5 ...et redoutés**

La récente pandémie de 2009, appelée grippe porcine ou grippe mexicaine est un sous type H1N1 dont la souche de référence est A/California/7/2009(H1N1). Ce virus a provoqué un émoi médiatique et a surpris la communauté scientifique ainsi que les groupes de surveillance des pandémies par sa rapidité de propagation à travers le monde. Ce virus d'origine aviaire a été probablement transmis à l'Homme par l'intermédiaire du porc et fort heureusement, il n'a pas été associé à une forte pathogénicité viro-induite; le nombre de morts est inférieur à 20 000 <sup>134</sup>.

N'omettons pas les gripes saisonnières à l'origine des épidémies hivernales qui frappent toutes les classes d'âge et peuvent se révéler tragiques principalement pour les personnes âgées, les sujets à risques ou les enfants. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS) (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/fr/>), la grippe serait grave dans 3 à 5 millions de cas et est la cause de plus de 300 000 morts chaque année, à l'échelle mondiale.

## **1.6 Un vaccin, des vaccins**

### **1.6.1 Pourquoi renouveler le vaccin annuellement ?**

Suite à l'absence d'un mécanisme de correction sur épreuve, la polymérase virale est à l'origine d'erreurs lors de la réplication, de l'ordre de un nucléotide muté par génome et par réplication <sup>135</sup>.

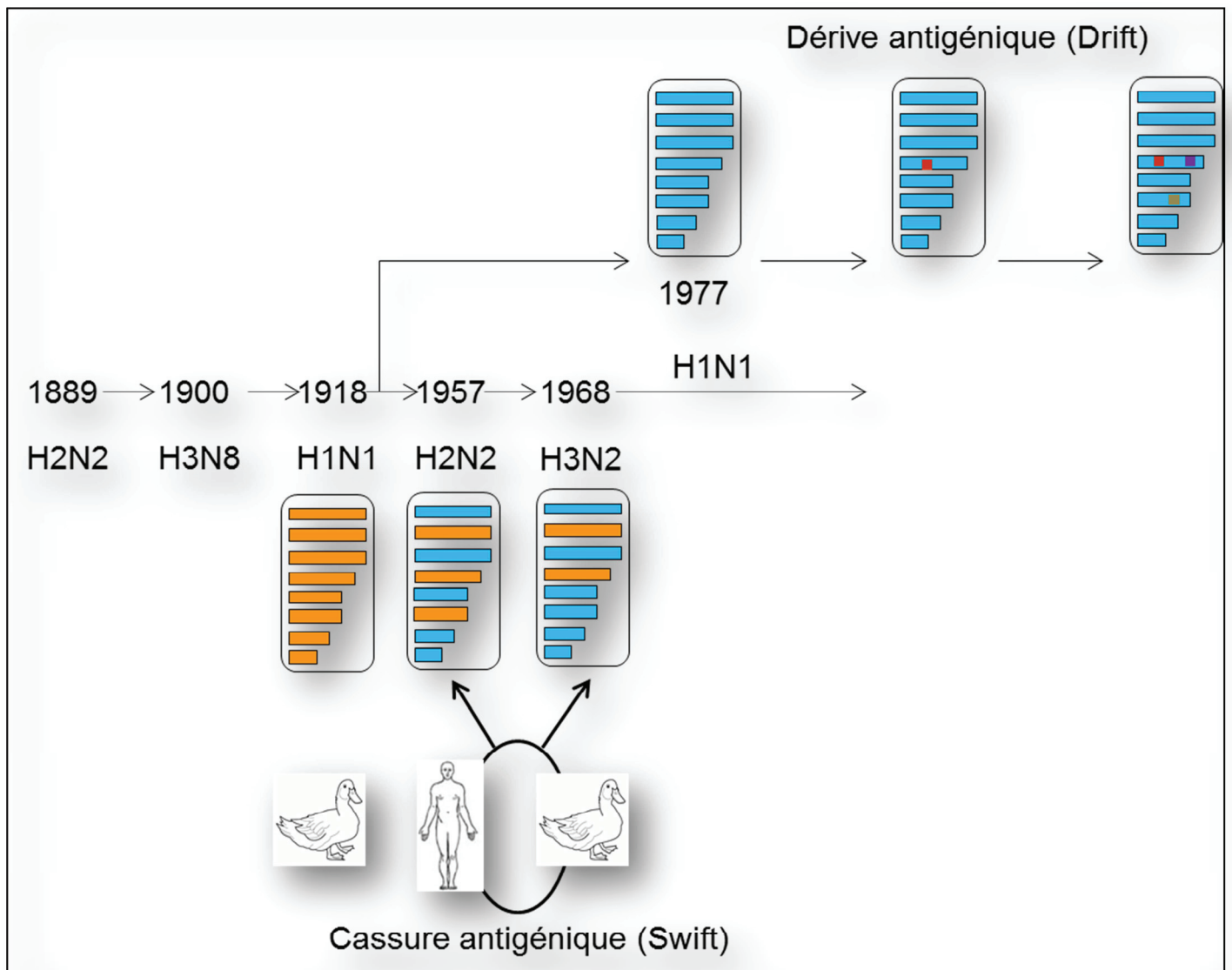


Figure 24: *Dérive et cassure antigénique*

L'étude génomique de l'évolution des souches virales à l'origine des pandémies de 1957 puis de 1968 montrent des cassures antigéniques comme l'émergence du H3N2 de 1968 issu du réassortiment sur fond génique du virus mortel H2N2 de 1957 et d'une neuraminidase (NA) d'origine aviaire (segment bleu qui passe au orange). Des erreurs de réplication virale sont à l'origine de mutations ponctuelles qui peuvent participer à l'émergence de certaines souches (point rouge). On parle alors de dérive antigénique.

Des études de mutation de l'antigène majeur (HA), ont été réalisées pour différentes souches <sup>136</sup> et montrent que des mutations apparaissent lorsque des pressions de sélection interviennent, comme la production par l'organisme d'anticorps neutralisants. Cela peut donner lieu à un avantage sélectif au virus, qui est conservé pour donner des variants dominants. Si ces mutations affectent les déterminants antigéniques localisés sur HA ou NA, la réponse immunitaire de l'hôte peut être affectée et on parle de dérive antigénique ou « drift » <sup>137</sup> (figure 24). Le taux de mutation du HA est estimé à 1% des acides aminés de la protéine par an <sup>138</sup>. Ces mutations ponctuelles n'entraînent pas de changement radical de l'antigénicité des protéines et expliquent les épidémies hivernales durant laquelle une population infectée conserve une immunité partielle sans pouvoir enrayer totalement la propagation du virus. D'autres modifications plus radicales du génome viral peuvent intervenir. Ainsi, il arrive qu'un même individu ou animal soit infecté par différentes souches pouvant faire émerger des virus réassortants ; on parle alors de cassure antigénique ou « shift » lors d'un changement des déterminant antigéniques HA et NA. Ce fut le cas pour les pandémies de 1957 (H2N2) et de 1968 (H3N2) qui résultèrent d'un réassortiment entre un HA et PB1 aviaire avec un fond de génome viral ciblant l'Homme (figure 24). Les recherches actuelles montrent que ces transferts de segment se sont fait progressivement et des segments aviaires auraient circulé parmi des virus ayant une affinité pour l'Homme durant cinq années avant le début de la pandémie de 1957 <sup>133</sup>. Ce phénomène fut également observé pour la pandémie de 1918 et reste redouté pour le virus aviaire H5N1 de 2003 qui, pour l'instant, présente un réservoir presque exclusivement aviaire avec seulement quelques cas de transmission sporadique à l'Homme.

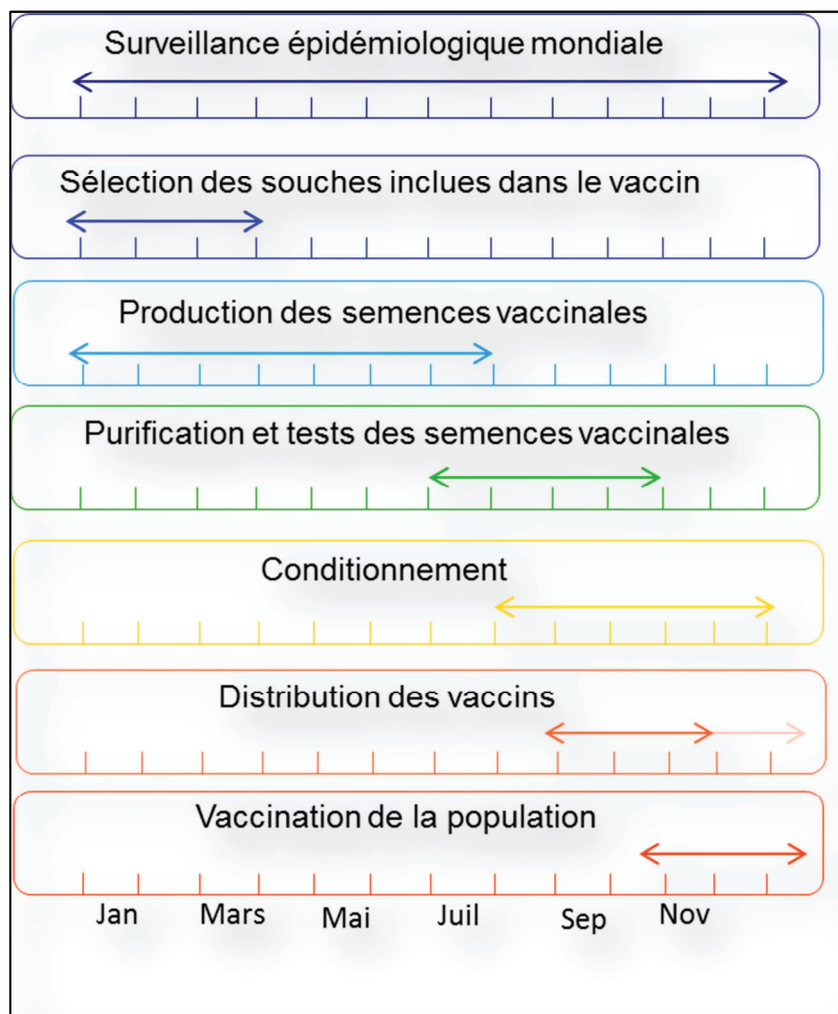


Figure 25: *Calendrier de la production d'un vaccin anti-Influenza A*

L'ensemble des étapes de la sélection des souches à la vaccination des populations s'étale sur une année complète. La production des semences vaccinales reste l'étape la plus longue et la plus limitante.

Un épisode pandémique peut alors démarrer lorsque des virus issus d'une cassure antigénique rencontrent alors des populations immunologiquement naïves vis-à-vis de leurs protéines. La pathogénicité virale est quant à elle plus complexe à comprendre et ferait intervenir d'autres éléments du cycle viral comme la capacité répliquative qui est indépendante de son antigénicité.

### **1.6.2 Production des vaccins**

En 1932, Shope écrit que l'administration de virus vivants prévient des risques de pneumonie chez le furet <sup>128</sup>. En 1935, Andrews, Smith et Laidlaw montrent que les furets produisent des anticorps neutralisants après une injection virale. Dès 1936, Francis et Magill obtiennent l'immunisation de patients après injection d'une suspension virale issue de tissu embryonnaire de poulet <sup>139</sup>. Ces travaux ont permis en 1940, de mettre au point les premiers vaccins antigrippaux par inoculation de souches virales dans les cavités allantoïque ou amniotique d'œufs de poule fécondés. Ces premiers vaccins sont monovalents et dirigés contre l'Influenza A (H1N1). A partir des années soixante, un vaccin bivalent est produit pour lutter contre l'Influenza A et Influenza B. Enfin, c'est à la fin des années soixante-dix qu'un vaccin trivalent est mis en place pour lutter contre l'Influenza A (H1N1) et (H3N2) et Influenza B. Chaque année, c'est l'OMS qui détermine les souches de référence à incorporer au vaccin auquel est ajoutée la souche PR8 qui est une souche non virulente mais qui permet d'optimiser la production virale. Les vaccins contre les virus de l'Influenza sont aujourd'hui développés à partir d'embryons de poulet infectés (dans l'œuf) ce qui présente l'avantage d'une forte production. Néanmoins, cette méthode a aussi des inconvénients comme le temps de production des semences vaccinales qui dure au moins quatre mois après la sélection des souches auquel

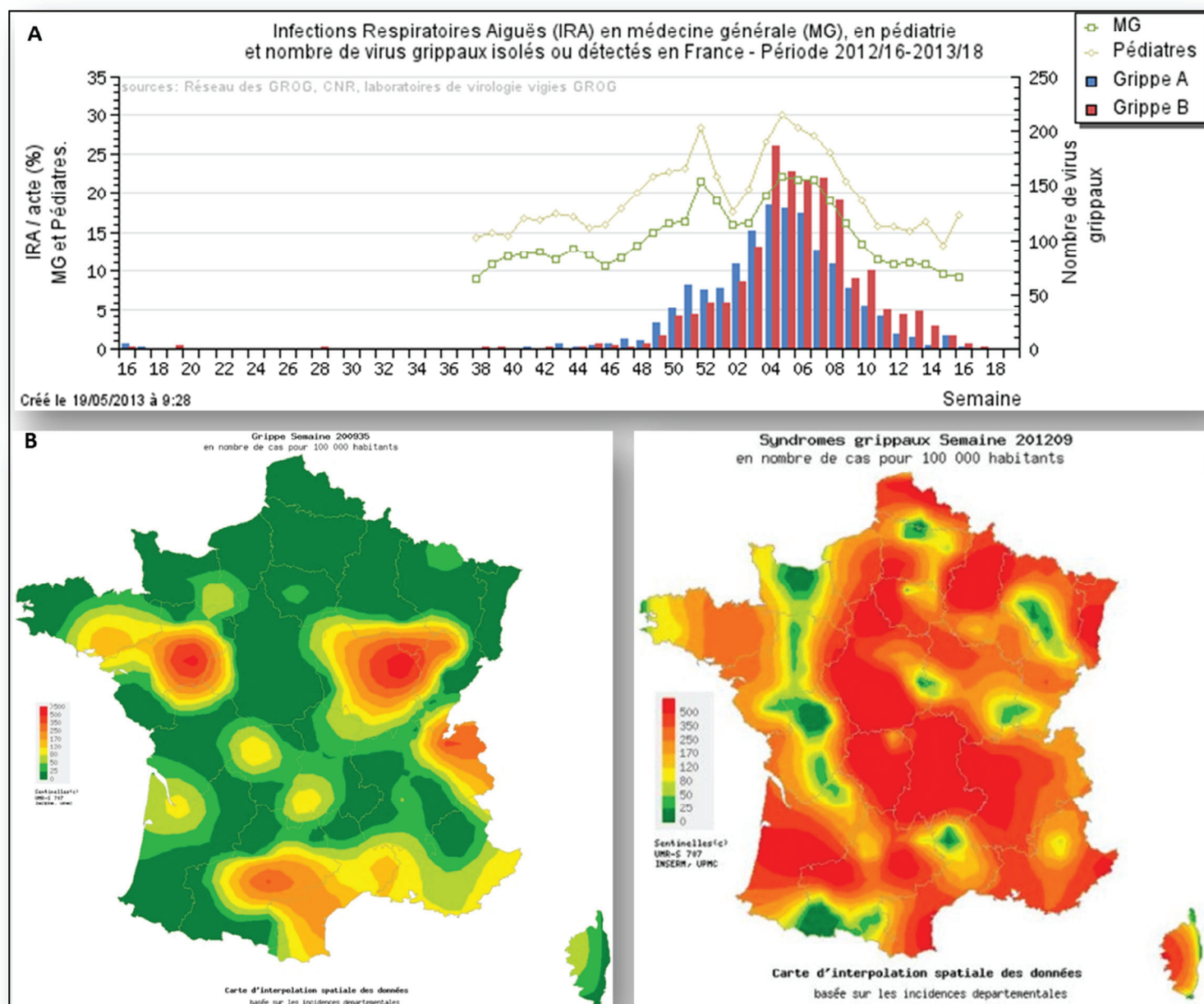


Figure 26: *Réseaux de surveillance du virus*

- (A) Graphique illustrant la période de forte contamination grippale sur l'année 2012-2013 (d'après le réseau GROG [www.grog.org](http://www.grog.org)).
- (B) Foyers grippaux en France en Mai (à gauche) et Septembre (à droite) 2012 (d'après le réseau sentinelles websenti.U707.jussieu.fr).

s'ajoute encore trois mois de purification et de conditionnement des vaccins avant qu'ils ne soient distribués. Autant, ces délais sont compatibles avec la mise en place de vaccins contre les grippe saisonnières autant ils sont bien trop longs pour répondre à une grippe pandémique (figure 25). Le cas de la grippe aviaire H5N1 de 2003 a montré les limites de la production de vaccin sur œuf. En effet, cette souche très virulente, détruisait les embryons avant que l'on ne puisse récupérer les protéines antigéniques. Ce problème a été résolu par la suite en infectant des œufs avec un H5N1 atténué. De plus, lors de la purification des vaccins, des particules d'œuf se retrouvent dans les doses vaccinales et peuvent s'avérer dangereuses en cas d'allergie à l'œuf pour les sujets sensibles.

De nombreuses alternatives ont été proposées comme la production sur cellules en culture <sup>140,141</sup> voire *in vitro*, par la production en lysat cellulaire de l'hémagglutinine <sup>142</sup>. Ces modes de production ont un avenir prometteur et n'ont rien d'inaccessibles car déjà mis en place pour d'autres virus comme le poliovirus dès 1961 <sup>143</sup> dont le vaccin est produit en cellule ou le virus de l'Hépatite B dont le vaccin est constitué de protéines recombinantes produites à partir de la levure *S. cerevisiae* depuis 1986 ([www.historyofvaccines.org](http://www.historyofvaccines.org)).

## **1.7 Les réseaux de surveillance de la grippe**

La détection précoce d'une épidémie peut limiter son impact sur une population. C'est pour cela qu'en France, différents organismes surveillent l'évolution des virus grippaux sur le territoire. Depuis 1984, les groupes régionaux d'observation de la grippe (GROG) forment un réseau d'alerte épidémiologique (figure 26). Médecins, pharmaciens et virologistes accumulent les données sur la circulation des virus grippaux. Le réseau sentinelles (INSERM U707) qui regroupe environ 500



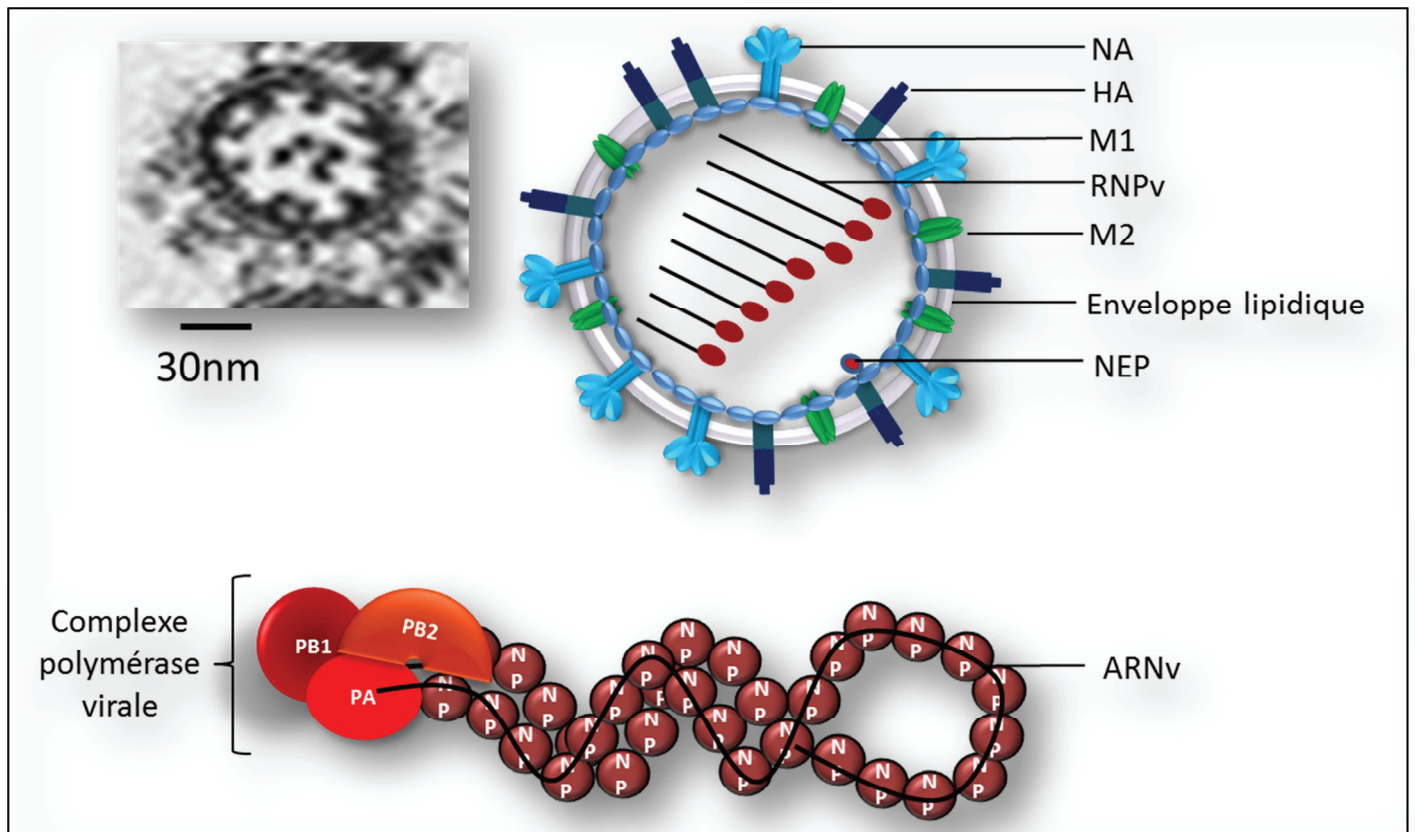


Figure 27: *La particule virale*

Electronographie (à gauche) du virus de l'Influenza A et sa représentation schématique (à droite) détaillant les différentes protéines structurales qui le composent et son information génétique fragmentée sous forme de 8 complexes ribonucléoprotéiques dont l'organisation est présentée en bas.

médecins surveille l'évolution de diverses maladies infectieuses dont la grippe. Enfin les centres nationaux de référence collaborent avec l'institut de veille sanitaire dans l'expertise sur le virus et la mise au point de techniques de diagnostic. A l'échelle européenne, l'European Influenza Surveillance Scheme (EISS) collecte des données cliniques en temps réel et contribue à la détermination des souches vaccinales. L'European Center for Disease prevention and Control (ECDC) favorise le développement de programmes nationaux de santé publique pour diminuer l'impact des épidémies et participe au développement de la recherche. A l'échelle mondiale, l'OMS coordonne les centres collaborateurs et recommande les souches virales de référence pour les vaccins, elle suit aussi l'évolution des virus et leur sensibilité aux antiviraux et vaccins ; elle donne aussi l'alerte en cas de pandémie.

## **2 Organisation de la particule virale**

L'Influenza A est un virus enveloppé à ARN. Les particules virales ont généralement un profil sphérique de 10nm de diamètre mais peuvent présenter des formes filamenteuses. L'enveloppe virale est issue de la membrane plasmique de l'hôte et la particule virale a une durée de vie de quelques minutes en milieu aérien (figure 27) (Fields 2005).

### **2.1 Génome viral**

Le génome des virus de l'Influenza A est fragmenté en 8 segments d'ARN simple brin et de polarité négative dont la taille varie de 890 à 2341 nucléotides (figure 28) (Fields 2005). Le nom de chaque segment et la ou les protéines qu'il code est résumé dans la figure 28. Les régions codantes sont bordées de part et d'autre de régions 5' et 3' non codantes courtes, de moins de 50 nucléotides qui regroupent

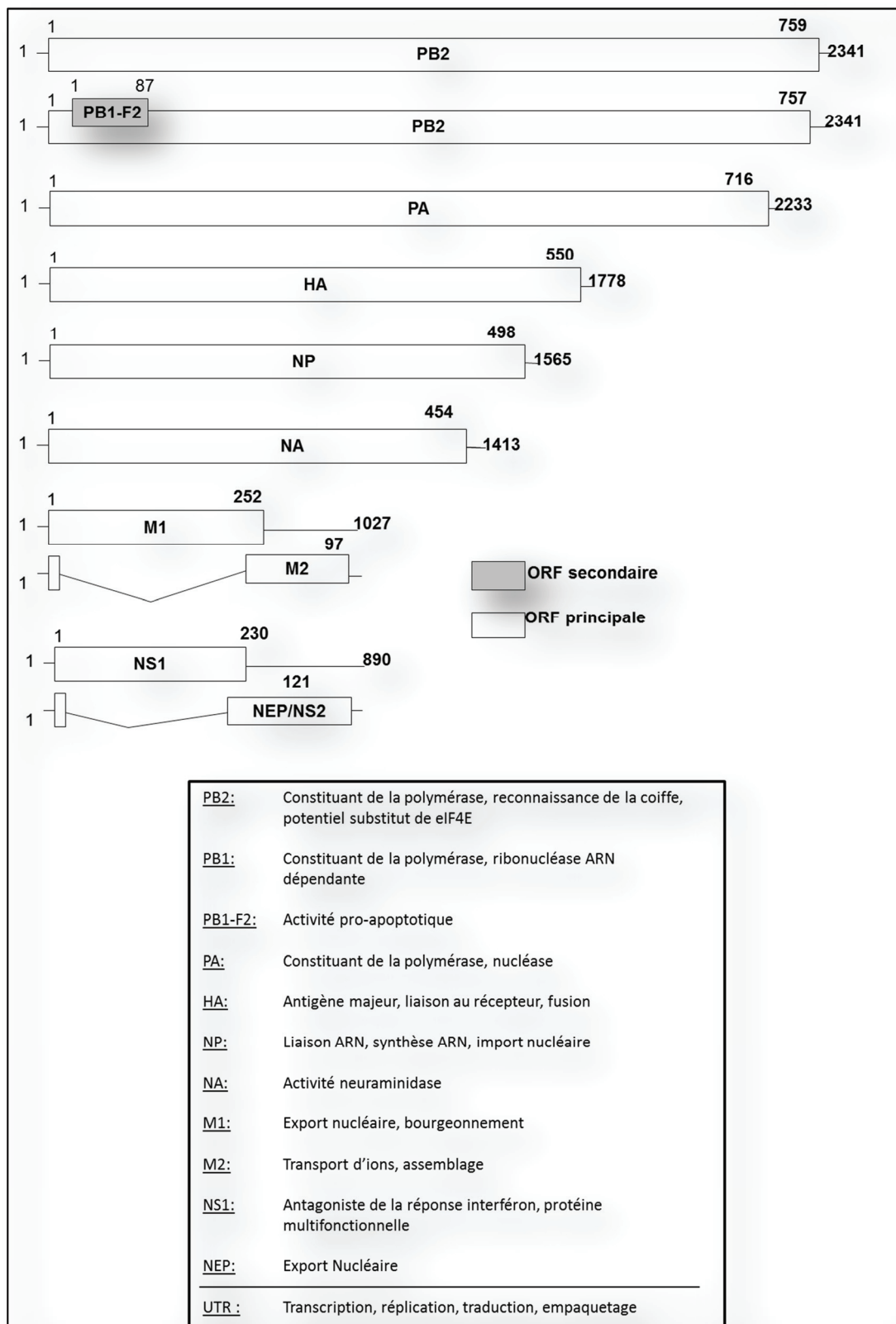


Figure 28: *Le génome viral*

Cadre de lecture des 8 segments d'ARN viral (à gauche) et les principales fonctions des protéines pour lesquelles ils codent (à droite) ainsi que les fonctions des régions non traduites (UTR).

les signaux nécessaires à la transcription, la réplication et l'empaquetage des différents segments.

## **2.2 Les protéines structurales**

L'hémagglutinine (HA) est une glycoprotéine membranaire trimérique d'environ 76 kDa. Sa principale fonction est la reconnaissance et la liaison à l'acide sialique qui sert de récepteur cellulaire <sup>144</sup>. Elle constitue les deux tiers des protéines membranaires, c'est l'antigène majeur des virus de type A. Sa structure se répartit en un domaine globulaire présentant cinq sites antigéniques et d'un domaine transmembranaire.

La neuraminidase (NA) s'organise en homotétramère à la surface des particules virales. Elle est ancrée à la membrane au niveau de ses domaines aminoterminaux (N-ter) hydrophobes. Le domaine extracytoplasmique possède une activité catalytique qui peut cliver un acide sialique (sialidase) ce qui permet la libération des virions néosynthétisés et leur propagation à travers le mucus pulmonaire <sup>145</sup>. Un rapport stoechiométrique entre HA et NA semble être critique pour l'attachement et le relargage de la particule virale et semble régulé <sup>146</sup>.

La protéine de matrice (M1) est la plus abondante au sein de la particule virale et lie la membrane lipidique, les queues des protéines membranaires et les ribonucléoparticules virales (RNPs) en tapissant la face interne de la membrane des particules virales <sup>147</sup>.

Le canal à proton (M2) est une protéine transmembranaire qui s'organise en homotétramère <sup>148</sup>. Sa fonction de canal ionique a été démontrée en 1992 par Pinto

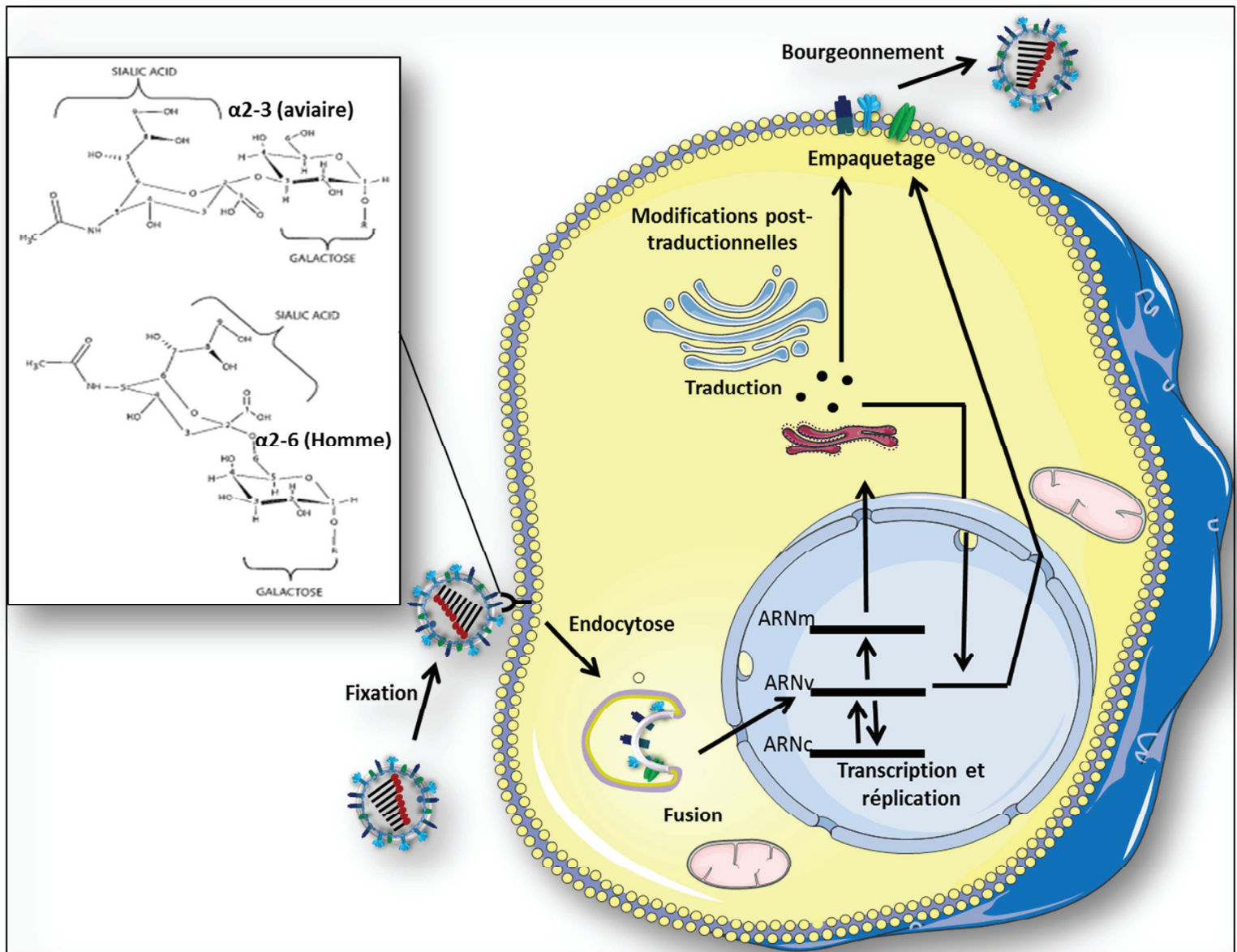


Figure 29: Cycle viral

Schéma simplifié du cycle viral de l'Influenza A et ses principales étapes. La structure moléculaire de l'acide sialique reconnu par l'hémagglutinine est détaillée ainsi que les différentes liaisons possibles avec le galactose

et collègues <sup>149</sup>, il permettrait l'entrée du virus dans la cellule infectée grâce à un changement de conformation dépendant du pH <sup>150</sup>.

Le génome viral n'est pas nu dans le virion mais s'enroule autour de nucléoprotéines (NP) à raison d'une NP tous les 24 nucléotides.

## **2.3 Les protéines non structurales**

Le complexe polymérase viral, constitué des protéines polymérases basiques (PB1 et PB2) et acide (PA), se lie sur les extrémités 5' et 3' des huit différents segments d'ARNs viraux <sup>151</sup> pour former un complexe ribonucléoprotéique viral (RNPv) (figure 27). Ces RNPv se présentent sous forme de bâtonnets de 12nm de diamètre et 30 à 120 nm de long <sup>152</sup>. La protéine d'export nucléaire (NEP) est également retrouvée dans les particules virales bien qu'on ne connaisse pas sa fonction à ce niveau <sup>153</sup>. La protéine NS1 et le polypeptide PB1-F2 issu du leaky scanning du segment PB1 cumulent tous deux de nombreuses fonctions dans la cellule hôte et ne sont pas retrouvés dans la particule.

## **3 Bref aperçu du cycle viral**

Le cycle viral (figure 29) débute par l'entrée du génome viral dans le cytoplasme de l'hôte pour être acheminé jusqu'au noyau, lieu de réplication et de transcription du génome. L'expression des protéines virales puis l'assemblage des néoparticules s'effectue dans le cytoplasme. La durée d'un cycle varie de 4 à 8 heures selon les souches <sup>154</sup>. Une cellule infectée peut permettre une dizaine de cycles réplicatifs avant d'entrer en apoptose. A terme, chaque cellule aura permis la libération de 10 000 à 100 000 particules virales <sup>154</sup>.

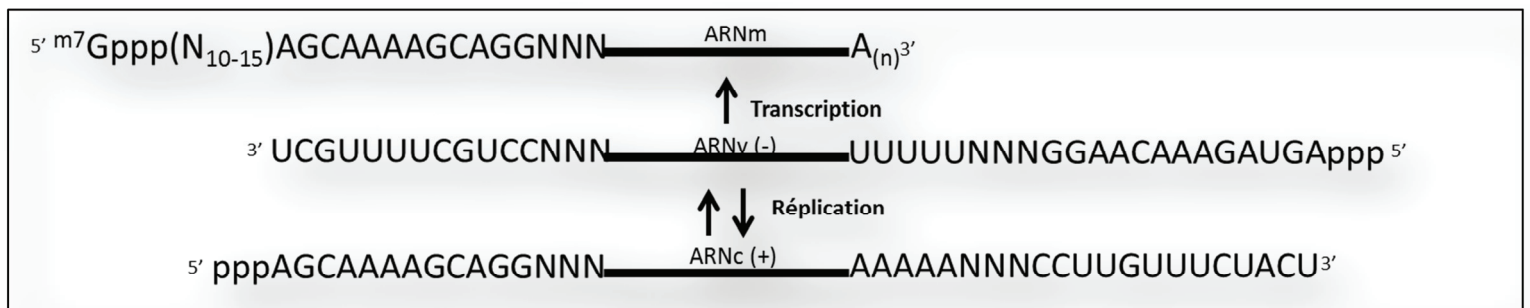


Figure 30: *Les trois types d'ARN exprimés lors de l'infection*

L'ARN viral (ARNv) de polarité négative, contenu dans la particule virale, sert de matrice à la fois pour la synthèse d'un ARNm (ARNm) coiffé et polyadénylé et également pour la synthèse d'un ARN complémentaire (ARNc) positif qui sert à son tour de matrice pour redonner plusieurs copies d'ARNv.



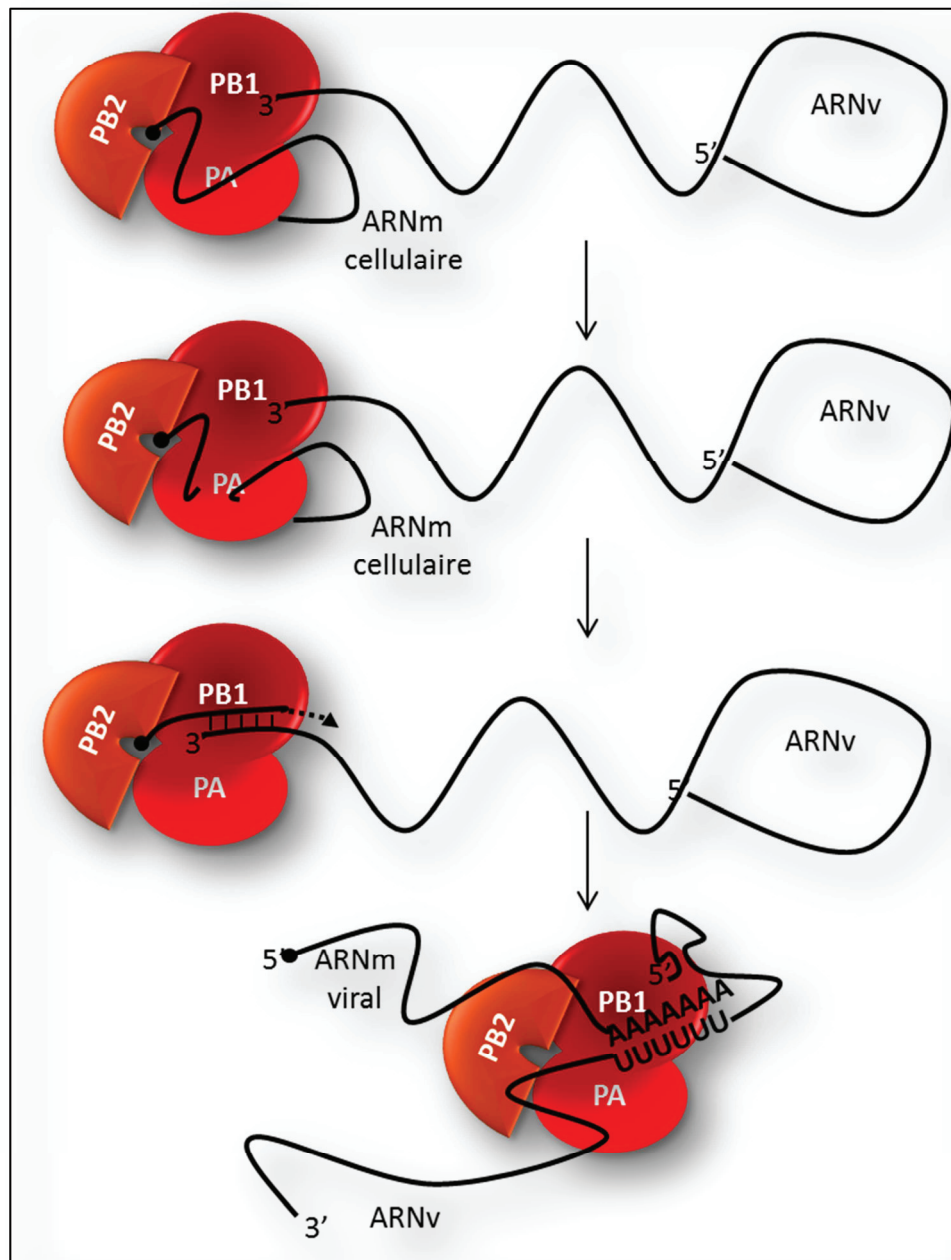
### 3.1 Reconnaissance des récepteurs cibles et entrée du virus

Le glycocalyx, manteau poly-osidique riche en glycoprotéines et protéoglycanes, tapisse les membranes plasmiques et assure de nombreuses fonctions cellulaires comme l'adhésion, la reconnaissance intercellulaire et la protection. Les glycoprotéines exhibent souvent à l'extrémité de la copule glucidique un acide sialique ou acide N-acétylneuraminique (NANA). Les HA des virus de l'Influenza A reconnaissent les acides sialiques liés au galactose en  $\alpha$ 2-3 ou  $\alpha$ 2-6 (figure 29) (Fields 2005). Les Influenza A humains (H1N1 et H3N2) ont une affinité plus grande pour les acides sialiques liés en  $\alpha$ 2-3 qui sont généralement localisés au niveau des épithéliums non ciliés de l'appareil respiratoire humain. Cette spécificité limite les transmissions de l'oiseau à l'Homme car les Influenza A aviaires ciblent plutôt les acides sialiques liés en  $\alpha$ 2-6. Une fois ancrées sur la cellule hôte, les particules virales sont internalisées dans des compartiments endosomaux clathrine-dépendants et indépendants <sup>155</sup>. Le canal à proton M2 entraîne une baisse de pH et provoque un changement conformationnel de HA qui permet de fusionner les membranes virales et endosomales <sup>156</sup>. Parallèlement, cette baisse de pH favorise la dissociation des RNPvs aux protéines M1 et ces RNPvs sont ensuite importés dans le noyau à travers les pores nucléaires. Chaque protéine composante du RNPv possède une séquence d'import nucléaire (NLS) mais il semble que seules les NP soient responsables de cet import <sup>157,158</sup>.

### 3.2 Transcription et réplication du génome

Trois types d'ARN viraux sont exprimés lors du cycle viral et leur organisation est présentée en figure 30. Les ARN du virion (ARNv) de polarité négative



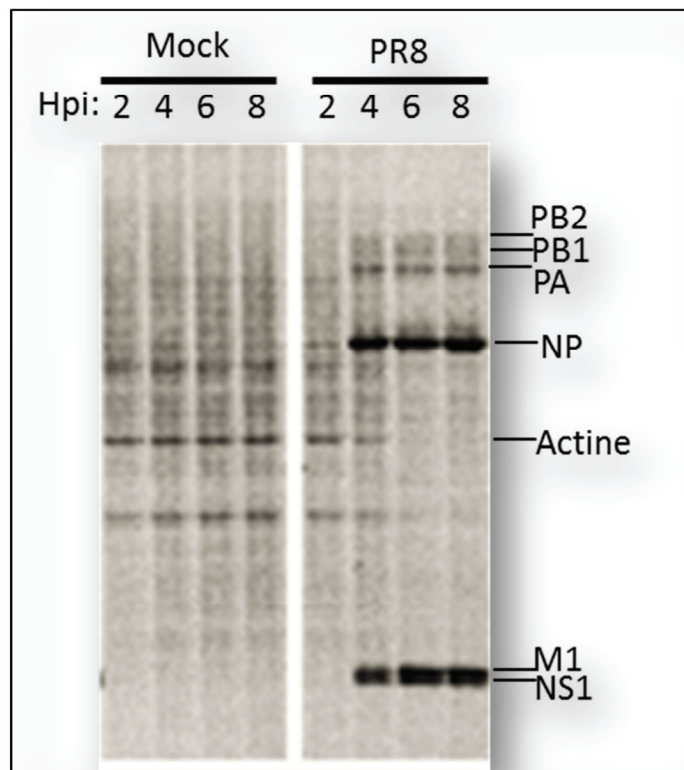


**Figure 31: Le capsnatching ou vol de coiffe**

La coiffe d'un ARNm cellulaire est reconnue par la PB2 puis clivée par la PA à 9 à 17 nucléotides en aval pour servir d'amorce à la PB1 lors de la synthèse de l'ARNm viral. La partie terminale de l'ARNv contient 5 uraciles qui servent de base à la synthèse de la queue poly(A) par lecture répétée de la PB1.

contiennent le génome viral et sont retrouvés dans les particules virales. Les ARN complémentaires (ARNc) de polarité positive sont la copie antisens complète des ARNv et servent uniquement de brin matrice permettant la réplication des nouveaux ARNvs. Enfin les ARN messagers viraux (ARNm) qui ont une polarité positive mais différent des ARNc au niveau de leurs extrémités 5' et 3' (figure 30). C'est le complexe polymérase viral qui prend en charge la transcription et la réplication en utilisant les 8 différents ARNv comme matrice (figure 28). Aucune polyadénylase cellulaire n'est recrutée. La polymérase virale ne possède pas d'activité méthyltransférase qui permettrait l'ajout d'une coiffe (7-méthylguanosine triphosphate, m7Gppp). Ces ARNm viraux sont néanmoins correctement coiffés, ce qui s'explique par le clivage, et l'incorporation en 5' de ces ARNm viraux, de la coiffe et des 9 à 17 nucléotides de l'extrémité 5' d'un ARNm cellulaire (figure 31). Cette partie 5' d'origine cellulaire sert ensuite d'amorce pour la transcription des ARNm viraux. Ce phénomène s'appelle le « capsnatching », et met en œuvre les actions coordonnées de PB2 qui se lie à la coiffe des ARNm cellulaires et de PA qui le clive<sup>159</sup>. A ce jour, il n'a pas été décrit de séquence « capsnatchée » consensus et le séquençage des 5'UTR des ARNm viraux semble montrer que ces séquences « capsnatchées » seraient prises aléatoirement<sup>160</sup>. Après « capsnatching », PB1 est l'ARN polymérase ARN dépendante qui synthétise l'ARNm viral. La queue poly A est produite par la polymérase virale qui réitère de nombreuses fois sa lecture au niveau de 4 à 6 uraciles de la 5'UTR de l'ARNv<sup>161,162</sup> (figure 31). Les nucléotides en aval des uraciles ne sont pas transcrits<sup>163</sup>. La queue poly(A) ainsi produite est d'environ 50 nucléotides<sup>164,165</sup>. Enfin lors de la transcription, les segments NS et M (figure 28) sont épissés via la machinerie cellulaire<sup>166,167</sup>.

La réplication des ARNv passe par la synthèse de l'ARNc (figure 30).



**Figure 32: Le shut off cellulaire**

Le shut off cellulaire s'observe par marquage radioactif de cellules infectées dès 4h après le début de l'infection et se caractérise par un arrêt de l'expression des protéines cellulaires et l'expression exclusive des protéines virales.

Chaque ARN sert de matrice à la synthèse de son brin complémentaire. Le passage de la transcription à la réplication virale ferait intervenir des structures différentes de l'ARNv au cours du temps <sup>168,169</sup>.

### 3.3 Synthèse et acheminement des protéines virales

Plusieurs publications ont montré qu'il existe une régulation temporelle de l'expression des gènes viraux <sup>163,170–172</sup> cependant le mécanisme n'est toujours pas résolu. On parle de gènes précoces comme NP et NS1, et de gènes tardifs comme HA et NA. L'accumulation disproportionnelle d'ARNm pour les différents segments a été observée <sup>173,174</sup> mais ne fait pas consensus selon les techniques d'étude employées <sup>175</sup>. De plus la quantité d'ARNm n'est pas complètement corrélée à la quantité de protéines précocement exprimées ce qui suggère une régulation

postranscriptionnelle. La majorité des protéines virales (PB2, PB1, PB1-F2, PA, NP, M1, NS1 et NEP) sont traduites dans la fraction soluble du cytoplasme. Ces protéines sont abondamment exprimées sans qu'un mécanisme de régulation de leur traduction n'ait été mis en évidence (voir ci-dessous). La surexpression des protéines virales peut être facilement mise en évidence par un radiomarquage des acides aminés et est corrélée très précocement à un arrêt de l'expression des gènes cellulaires ou shut off (figure 32). Les protéines NA et M2 ainsi que le précurseur de HA (nommé HA<sub>0</sub>) sont exprimées au niveau du réticulum endoplasmique (REG) de la cellule hôte (figure 1). HA<sub>0</sub> et NA sont alors glycosylées au niveau de leur passage par l'appareil de Golgi. Le canal à proton M2 va ensuite équilibrer le pH dans le *trans* Golgi ce qui permet la maturation de HA. C'est à ce niveau que HA se trimérise et que NA et M2 se tétramérisent. L'adressage des protéines à la membrane se fait à partir du *trans* Golgi jusqu'aux radeaux lipidiques où HA et NA s'intègrent <sup>176</sup>.



### **3.4 Export, transport, emballage des RNPvs et bourgeonnement viral**

L'export nucléaire des RNPvs ne débute qu'après l'expression des gènes tardifs, notamment les protéines M1 et NEP. Il a été montré que M1 favorise l'export des RNPvs et bloque leur retour dans le noyau <sup>177</sup>. Ce mécanisme fait intervenir la protéine NEP qui est un intermédiaire indispensable entre le complexe RNPv, la protéine M1 et l'exportine cellulaire CRM1 <sup>178</sup>. Les RNPvs sont ensuite acheminées jusqu'à la membrane cellulaire par le réseau du cytosquelette <sup>179</sup>. Pour être infectieuse, une particule virale doit renfermer les huit segments viraux. Ainsi, un premier modèle suggère l'emballage aléatoire des huit segments. Ce modèle s'appuie sur l'observation par microscopie électronique que certaines particules virales contenaient plus de huit ARN viraux <sup>180,181</sup>. Un second modèle propose l'emballage spécifique de chaque segment grâce à un motif nucléotidique d'emballage défini. Cette hypothèse repose sur des données montrant que les RNPvs sont présentes en quantité équimolaire dans les particules virales <sup>182</sup> alors qu'elles sont en ratios différents dans les cellules infectées <sup>183</sup> et des séquences nécessaires à l'emballage ont été identifiées dans chaque segment <sup>184–187</sup>. Enfin, lors du bourgeonnement, les RNPvs sont incorporées dans la particule par action des filaments d'actine et s'achève par scission de la particule. L'agrégation des particules virales par l'interaction entre HA et l'acide sialique est limitée par l'activité sialidase de NA ce qui souligne la nécessité d'un équilibre fonctionnel entre HA et NA pour la libération optimale des virions.



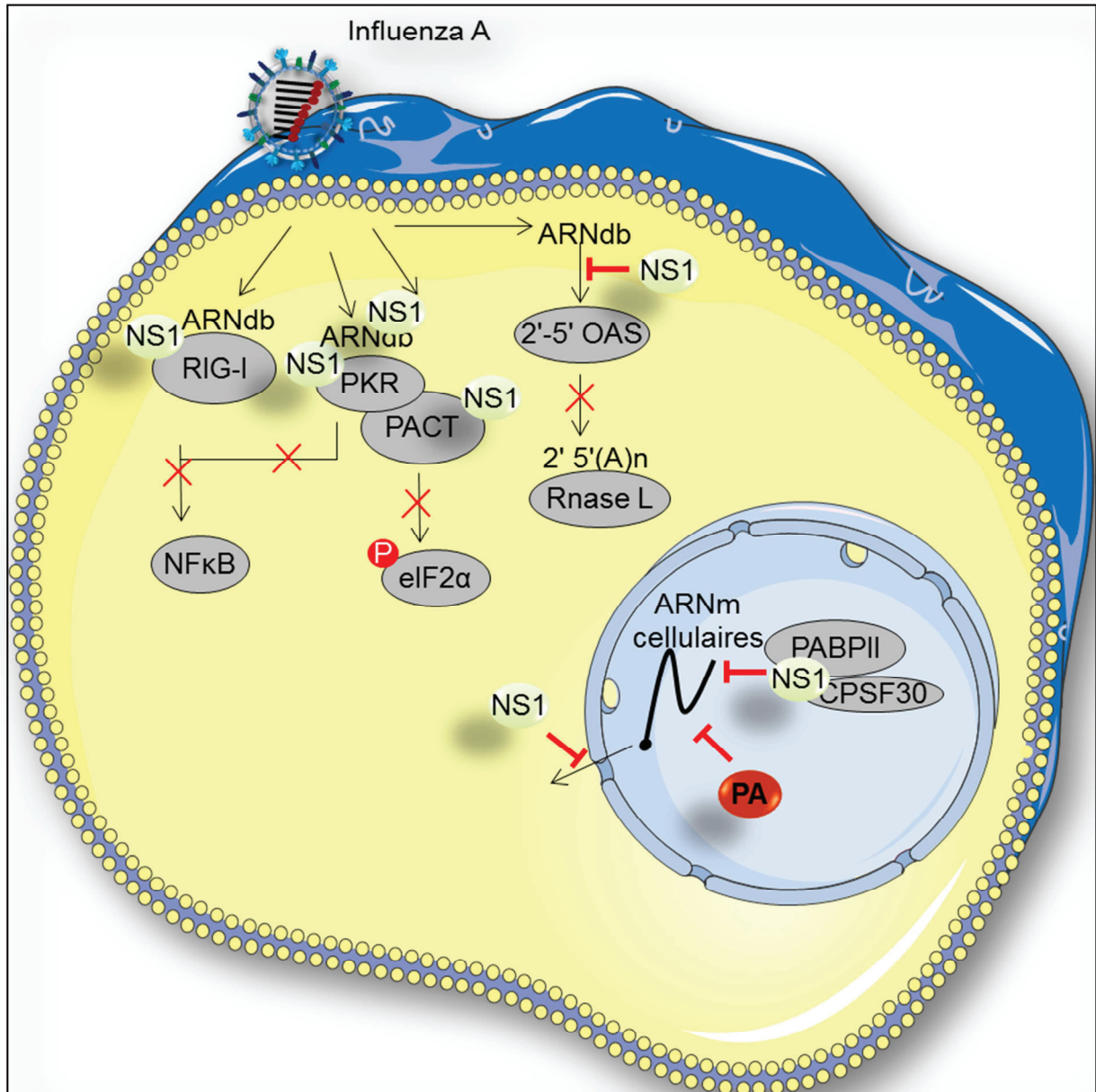
## 4 La réponse cellulaire et Shut off

Pour contenir la prolifération virale, les cellules infectées développent de multiples réponses antivirales <sup>188</sup>. Les interférons regroupent des cytokines qui activent la transcription de gènes cibles de la réponse antivirale de manière autocrine et paracrine.

### 4.1 La réponse antivirale cellulaire

Ce sont les interférons de type  $\alpha$  et  $\beta$  qui vont activer la 2'-5'oligoadenylate synthétase (OAS), à l'origine de la dégradation des ARN d'origine cellulaire ou virale <sup>189</sup> entraînant un rétrocontrôle positif qui induit de *novo* l'expression d'interféron. Les premières études sur l'induction de la réponse interféron ont montré que l'ARN double brin (ARNdb) joue un rôle clé dans cette activation <sup>190</sup>. L'ARNdb active la protéine kinase R (PKR) qui phosphoryle la sous-unité  $\alpha$  du facteur d'initiation de la traduction eIF2 et limite la synthèse des protéines virales et cellulaires <sup>191</sup>. La réponse interféron déclenche également l'apoptose cellulaire médiée essentiellement par la voie NF $\kappa$ B. Le fait que les protéines qui concourent au mécanisme d'apoptose soient déjà présentes à l'état latent dans la cellule, permet une mise en place rapide du processus (moins de 2 heures). Ainsi, la cellule meurt avant que le virus n'ait pu réaliser son cycle de réplication.





**Figure 33: Détournement de la réponse antivirale par l'Influenza A**

Les différentes voies de signalisation cellulaire qui aboutissent à l'arrêt de la synthèse des protéines et l'entrée en apoptose lors d'un stress cellulaire sont bloquées principalement par la protéine virale NS1 qui interagit directement avec les protéines effectrices ou en interagissant en amont de ces voies avec l'ARN double brin. PA agit également en clivant les ARNm ce qui empêche toute expression des gènes apoptotiques.

## 4.2 La stratégie de l'Influenza A

Les virus de l'Influenza A ont développé de nombreux mécanismes pour contourner cette réponse antivirale cellulaire. Certaines stratégies sont spécifiques de chaque souche comme l'augmentation de la vitesse intrinsèque de réplication<sup>192,193</sup> ce qui permet le bourgeonnement rapide de nouveaux virions. A ces réponses, s'ajoute un mécanisme consensus chez les différentes souches virales qui consiste à bloquer les différentes voies de signalisation cellulaire permettant la synthèse d'interféron (figure 33). Ainsi les virus de l'Influenza A bloquent les voies PKR et RIG-I qui activent le processus d'apoptose en libérant le facteur NFκB. Le virus bloque également la voie induite par l'OAS empêchant la dégradation des ARN. De plus l'ensemble de la machinerie d'expression des gènes cellulaires est affectée et détournée au profit du virus, on parle de shut off cellulaire (figure 32). L'ARN polymérase II est inhibée<sup>194,195</sup> ainsi que la maturation des ARNm cellulaires et leur export<sup>196,197</sup>. De plus, le « capsnaatching » des ARNm cellulaires qui permet la transcription virale participe aussi à la rapide dégradation des ARNm cellulaires<sup>198</sup>. L'ensemble de ces phénomènes aboutissent à un shut off cellulaire, et il ne semble pas y avoir d'étape d'expression des gènes qui soit particulièrement ciblée. La protéine NS1 est l'acteur moléculaire principal qui assure le détournement de la réponse antivirale et est développé plus loin.

## 4.3 L'entrée en apoptose viro-induite

Les virus de l'Influenza A inhibent l'entrée précoce en apoptose mais il a été montré qu'ils la déclenchent tardivement<sup>199,200</sup> par différentes voies cellulaires : activation de PKR<sup>201</sup>, stimulation de Fas<sup>202</sup>, activation stress dépendant<sup>203</sup> et activation via le facteur TGF-β pouvant être stimulé par NA<sup>204</sup>. Ces voies de signalisation aboutissent, entre autres, à l'activation du facteur transcriptionnel NFκB.



Enfin, la protéine PB1-F2 décrite depuis le début des années 2000 est un facteur pro-apoptotique qui agit au niveau des voies mitochondriales<sup>205–207</sup>. Ce revirement de situation sur le déclenchement de l'apoptose s'expliquant par une meilleure libération des particules virales lorsque la cellule hôte entre dans le processus de mort cellulaire programmée.

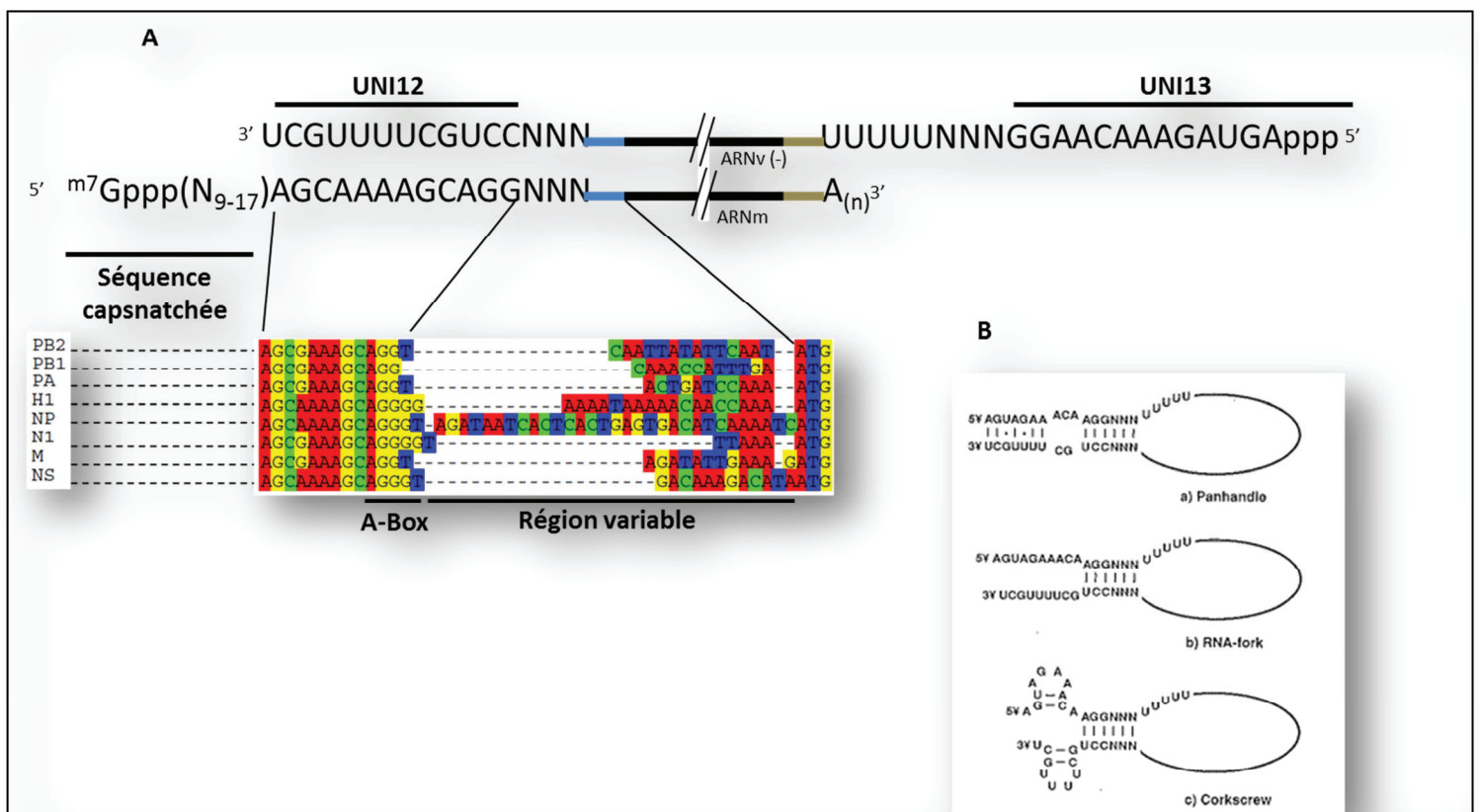


Figure 34: *Organisation des UTR virales*

- (A) Les UTR virales possèdent des séquences très conservées pour l'ensemble des 8 segments appelées UNI12 (extrémité 3' de l'ARNv) et UNI13 (extrémité 5' de l'ARNv). La région entre UNI12 et l'AUG initiateur est propre à chaque ARN (région variable) mais très conservée parmi les différentes souches virales en comparaison des régions codantes.
- (B) La complémentarité partielle entre les 3' et 5' UTR favorise des structures en boucle de l'ARN dite en poêle à frire, en fourche ou en tire-bouchon.

## 5 Précisions sur les UTR virales

Le virus de l'Influenza A est constitué de 8 segments d'ARN contenant un, ou deux, cadre ouvert de lecture (ORF) qui est borné par une 5' et 3' région non codante (NCR) et qui sont nommées par extension des régions non traduites (UTR) dans le cas d'une étude basée sur les ARNm viraux (figure 28). Ces UTR sont le sujet de nombreuses études notamment sur les diverses fonctions auxquelles elles participeraient au cours du cycle viral.

### 5.1 Organisation des UTR virales

Le séquençage des extrémités des ARNv reste techniquement difficile aujourd'hui, mais de nombreuses techniques de plus en plus performantes permettent sa réalisation et l'observation du taux de variabilité dans ces séquences<sup>208</sup>. Szymkowiak<sup>209</sup> et Wit<sup>210</sup> ont proposé deux méthodes de séquençage rapide des UTR virales permettant d'étudier l'évolution de ces séquences en parallèle de l'évolution du virus. Elles s'appuient sur la technique d'amplification rapide des extrémités d'ADNc (RACE) et l'analyse des séquences a montré que les 12 premiers nucléotides en 3' et les 13 premiers nucléotides en 5' des régions non codantes étaient conservés parmi tous les segments d'ARNv et appelés UNI12 et UNI13 respectivement<sup>211</sup> (figure 34). Dans leur ensemble, les UTR sont plus conservées que la région codante de chaque segment<sup>212</sup> et relativement courtes puisqu'elles sont constituées de 18 à 45 nucléotides pour la 3'UTR de l'ARNv et 20 à 58 nucléotides pour la 5'UTR de l'ARNv; entre les régions UNI12-codon initiateur et UNI13-codon stop, on trouve des régions nucléotidiques variables<sup>56</sup>. Enfin, les régions 5' et 3' UTR peuvent s'associer pour former différentes structures : poêle à frire, tire-bouchon et fourche qui favoriseraient le passage de la transcription à la réplication<sup>169,213</sup> (figure 34).



## 5.2 Les multiples fonctions des 5'UTR

Les UTR virales constituent le promoteur responsable de la transcription/réplication des gènes viraux <sup>168</sup> car elles se lient au complexe polymérase viral <sup>169,214</sup>. Une simple mutation dans une région conservée de ces séquences inhibe la transcription <sup>169,215</sup>. Ainsi, la délétion des régions 5' et 3' UTR spécifiques du segment NA a montré une diminution de la concentration de cet ARNv dans les cellules infectées et un phénotype viral atténué en culture de tissu <sup>216</sup>. Un modèle structural des régions non traduites propose une organisation en poêle à frire des extrémités des ARNv qui constituerait le promoteur transcriptionnel <sup>56,211,213</sup>. A cette structure, sont aujourd'hui proposés deux autres modèles d'organisation des UTR en tire-bouchon et en fourche <sup>169,213</sup>. De plus, la délétion d'une partie des régions non traduites pour le segment NS réduit l'incorporation des ARNv dans les virions, ce qui suggère que ces régions pourraient contrôler l'empaquetage viral au niveau de leur domaine segment spécifique <sup>185</sup>. L'autre fonction des UTRs est de jouer un rôle clé dans l'habillage des ARNm viraux. Ainsi, la polymérase virale ne possède pas d'activité permettant l'ajout de la coiffe méthylée en 5' de l'ARNm. Pour pallier à cela, une séquence de 9 à 17 nucléotides <sup>160,214,217</sup> est ajoutée de manière covalente à l'extrémité des 5' des ARNm viraux, on parle de vol de coiffe ou capsnatching. Cette séquence d'origine cellulaire est utilisée à la fois comme amorce lors de la synthèse de l'ARNm viral mais aussi comme site de fixation du ribosome et des facteurs associés au cours de l'initiation de la traduction. Enfin, la synthèse de la queue poly(A) en 3' de l'ARNm est rendue possible par une suite de 4 à 5 uridines dans la 5'UTR de l'ARNv. Cette séquence est lue plusieurs fois par la polymérase virale, formant ainsi une queue poly(A) d'environ 50 nucléotides pour les différents ARNm viraux <sup>165,218</sup>.



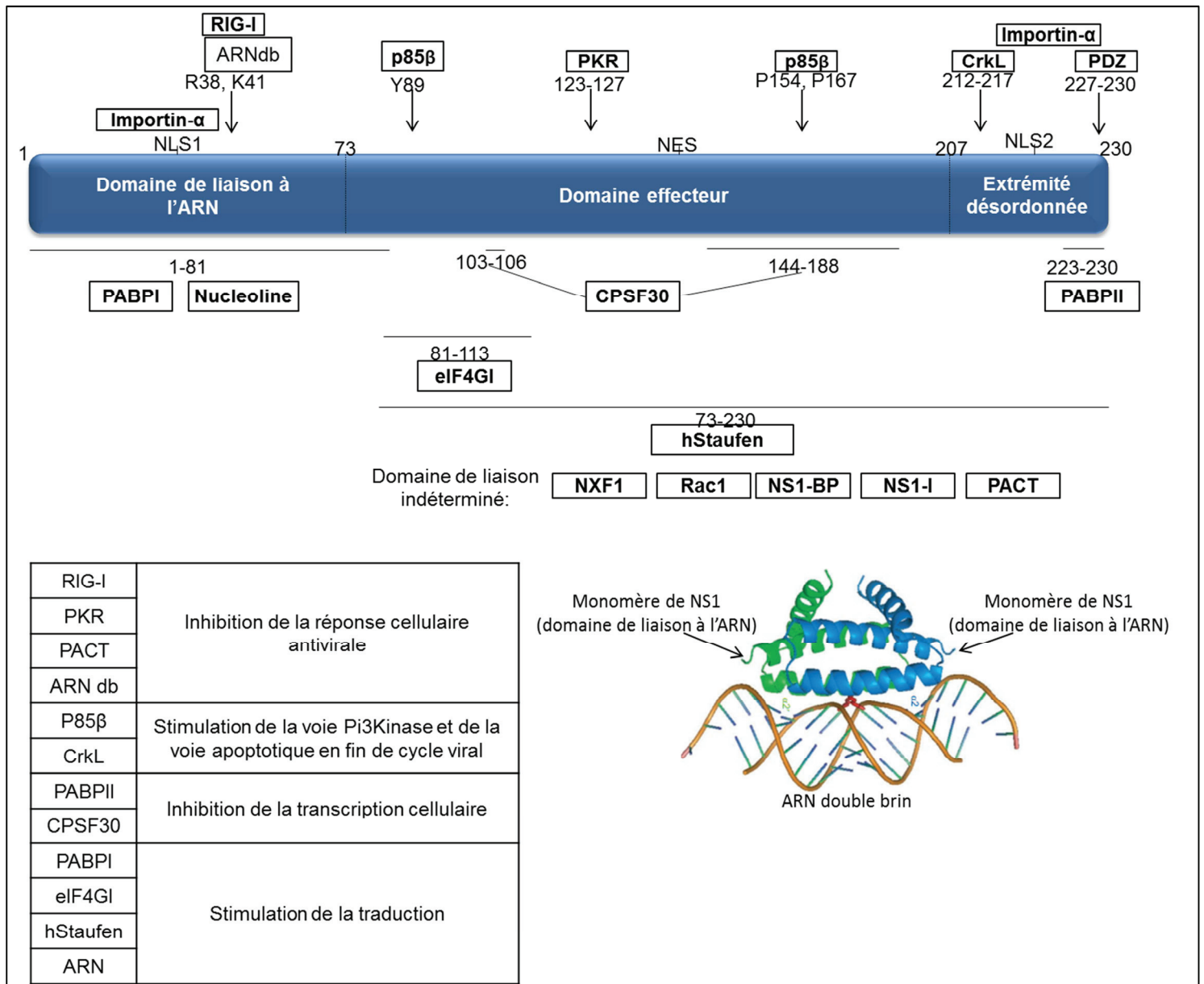


Figure 35: Carte des motifs d'interaction de NS1

Localisation des différents domaines d'interaction de NS1 avec des protéines cellulaires ainsi que leurs principales fonctions dans le métabolisme de la cellule (tableau). Le domaine de liaison à l'ARN est localisé au niveau de la région N-terminale de la protéine qui se dimérise sur l'ARN (d'après Wang 1999 <sup>219</sup>).

## **6 Précisions sur la protéine virale NS1 : une protéine multifonctionnelle**

NS1 est une protéine abondamment exprimée dans les cellules infectées mais n'est pas retrouvée dans les virions <sup>126,220</sup>. C'est la protéine la plus étudiée en tant qu'antagoniste de la réponse cellulaire antivirale<sup>189,221–223</sup> et elle assure de nombreuses fonctions dans la réplication et la virulence : régulation temporelle de la synthèse des ARNv, stimulation de la traduction des ARNm viraux, régulation de la morphogénèse de la particule, suppression de la réponse immunitaire et apoptotique de l'hôte, puis activation de la voie PI3Kinase, implication dans la pathogénèse souche dépendante <sup>189</sup> (figure 35). Cet ensemble de propriétés est lié à la capacité de NS1 à participer à une multitude d'interactions protéine-protéine et protéine-ARN.

### **6.1 Structure de la protéine et ses interactants cellulaires**

NS1 est synthétisée à partir du segment 8 qui donne également la protéine NEP après épissage <sup>224</sup> (figure 28). C'est une protéine de 230 à 237 acides aminés dimérique <sup>126</sup> qui peut se retrouver dans les compartiments nucléaire et cytoplasmique et elle est capable de se lier à l'ARN <sup>225,226</sup> en se multimérisant à son contact <sup>227</sup>. Un monomère de NS1 est constitué de trois domaines : (i) Le domaine de liaison à l'ARN se situe au niveau des acides aminés 1-73 <sup>225,228</sup>. La structure de cette région a été obtenue par cristallographie et RMN et révèle une structure symétrique en homodimère à six hélices (figure 36). La seconde hélice de chaque monomère constitue un site de liaison aux acides nucléiques car il est riche en arginine. L'introduction de mutations ponctuelles a montré que les acides aminés arginine 38 et lysine 41 sont nécessaires pour la liaison de NS1 sur l'ARN <sup>219</sup> en interagissant avec le groupement phosphate des acides nucléiques <sup>208,228</sup>, ce qui expliquerait l'absence de séquence spécifiquement reconnue par NS1. La partie N-



terminale de NS1 est aussi connue pour lier la PABPI <sup>229</sup>. (ii) Le domaine effecteur de NS1 (74aa à 206aa) s'associe avec le facteur de clivage polyadénylation CPSF30 <sup>196,230</sup>, le facteur d'initiation de la traduction eIF4G <sup>231</sup>, la protéine d'adressage hStaufen <sup>232</sup>, ainsi que la protéines PKR <sup>233</sup>. C'est le domaine effecteur qui semble assurer la plupart des fonctions de NS1. (iii) Enfin, le domaine non structuré qui comprend les acides aminés 207 à 237 lie la protéine cellulaire PABPII. Le domaine de liaison à l'ARN et le domaine non structuré possèdent chacun une séquence d'import nucléaire (NLS) qui se lie à l'importine alpha <sup>189</sup>. La protéine NS1 interagit également avec de nombreuses autres protéines cellulaires mais les domaines d'interaction n'ont pas été caractérisés (Hale pour revue <sup>189</sup>).

## 6.2 Les multiples fonctions de NS1

Cette partie se concentre surtout sur les fonctions de NS1 qui agissent en amont de la traduction. L'ensemble des fonctions de NS1 est traité très en détail dans la revue de Hale et collègues <sup>189</sup>. NS1 affecte la réplication virale à plusieurs niveaux (figures 33 et 35), notamment par une autorégulation de sa propre synthèse en inhibant l'épissage du segment qui permet son expression <sup>166,234</sup> et des expériences de mutations/délétions dans le segment NS ont montré que NS1 régule la quantité des ARNv sans affecter les proportions d'ARNm et d'ARNc <sup>235,236</sup>. Cette fonction s'expliquerait par son interaction avec le complexe polymérase <sup>237</sup> et la stabilisation de la structure en poêle à frire des UTR virales <sup>225,238</sup>. NS1 intervient également dans plusieurs étapes post-transcriptionnelles en s'associant aux facteurs CPSF30 <sup>196</sup> et PABPII <sup>197</sup> ce qui bloque le clivage-polyadénylation des ARNm cellulaires. L'export des ARNm est également bloqué par une interaction de NS1 avec les différents éléments d'export nucléaire comme la voie d'export NXF1/TAP <sup>239</sup>. Au niveau des différentes voies de signalisation cellulaire, NS1 joue le rôle



d'antagoniste de la réponse interféron en inhibant la voie PKR<sup>222,238</sup>. Cette action est médiée par une interaction NS1-ARN double brin qui ne permet plus la fixation de PKR et son activation<sup>240</sup>; cependant il est à noter que NS1 lie également directement PKR et l'empêche de se dimériser<sup>233,241</sup>. Ainsi, l'inhibition de PKR empêche la formation de granules de stress et empêche également la cellule d'entrer en apoptose<sup>242</sup>.

## **7 Influenza et traduction**

Nous voici au cœur de mon sujet de thèse qui peut se résumer par une simple question : Comment procèdent les virus de l'Influenza A pour détourner la machinerie traductionnelle de l'hôte infecté ? Les données de microscopie électronique montrent que les cellules infectées présentent des structures cytoplasmiques cristallines enrichies en protéines ribosomales et NS1<sup>243-245</sup>. Ces observations sont complétées par des données structurales et fonctionnelles qui permettent d'élaborer un modèle de traduction viral.

### **7.1 Les premières approches par co-infection**

Tout comme les ARNm de la cellule hôte, la traduction des ARNm de l'Influenza A est dépendante de l'entrée du complexe ribosomique au niveau de la coiffe en 5'. Cela a été montré par Garfinkel<sup>246</sup> qui a réalisé des co-infections Influenza et Poliovirus. Ce dernier code pour la protéine 2A qui clive le facteur d'initiation eIF4G ce qui entraîne une forte diminution de la traduction des ARNm cellulaires et favorise la traduction des ARNm viraux possédant une séquence d'entrée interne des ribosomes (IRES). Lors de la co-infection Influenza/Poliovirus, il est observé une forte inhibition de l'expression des protéines de l'Influenza ce qui suggère l'utilisation d'un mécanisme coiffe dépendant pour la traduction. Cependant



Garfinkel et collègues ne présentent pas de western blot montrant le clivage d'eIF4G et il est possible que d'autres événements interviennent dans l'arrêt de l'expression des protéines du virus de l'Influenza A au cours de cette co-infection. Une autre approche a été réalisée par Feigenblum <sup>247</sup> en réalisant des co-infections Influenza /Adénovirus. L'expression de l'Adénovirus empêche la phosphorylation du facteur eIF4E ce qui diminue son affinité pour la coiffe. L'initiation de la traduction des ARNm cellulaires dépendante de la coiffe se trouve donc fortement inhibée. Cependant, dans ces conditions, les données de Feigenblum montrent que les protéines de l'Influenza A sont bien exprimées au détriment de celles de l'Adénovirus. Ces observations suggèrent que la dépendance de l'Influenza A par rapport au facteur de reconnaissance de la coiffe eIF4E est faible, ce qui semble paradoxal avec les résultats obtenus par Garfinkel. Ces éléments nous amènent à nous interroger sur les rôles respectifs de eIF4G et de eIF4E dans la traduction des ARNm du virus de l'Influenza A.

## **7.2 Place des 5'UTR dans la traduction virale**

Les 5'UTR des ARNm sont connues pour leur rôle dans le recrutement des complexes d'initiation de la traduction. Des alignements de séquences montrent que les 5'UTRs des ARNm de l'Influenza A sont, à l'exception de la partie « caps-natchée », très conservées d'une souche à l'autre et possèdent une région identique sur chaque ARN viral appelée UNI12. Cependant, la région entre UNI12 et le codon d'initiation est très variable d'un ARN à l'autre à la fois au niveau de la taille et de sa composition nucléotidique et cette variabilité est conservée pour les différents sous-types viraux. Par ailleurs, les 5'UTR des ARNm viraux sont relativement petites, 18 à 45 nucléotides, et l'apport d'une séquence de 9 à 17 nucléotides lors du « caps-natching » <sup>160,217</sup> modifie de 20 à 50 % la séquence de la





5'UTR des ARNm viraux. L'ensemble des ARNm de l'Influenza A est donc caractérisé par huit 5'UTR constituées de séquences aléatoires « capsnaatchées » suivie d'une séquence conservée UNI12 puis une séquence nucléotidique variable et spécifique à chaque segment d'ARNm . Compte tenu de l'importance de la région 5'UTR d'un ARNm sur sa traduction, il est légitime de se demander si ces 5'UTR ont une importance dans le contrôle de l'expression des protéines virales.

### 7.2.1 Contexte Kozak des 5'UTR

Les 5'UTR des ARNm Influenza ont une taille comprise entre 30 et 60 nucléotides (capsnaatche+UNI12+région variable) et ne sont pas structurées. L'étude du contexte autour du codon initiateur montre que sept segments ont un contexte favorable à l'initiation de la traduction suivant les règles définies par Kozak <sup>24</sup> : **G/AnnAUGG** et le segment PB1 est le seul à posséder un contexte défavorable (**UgaAUGG**). L'étude de mutants sur ce contexte en condition d'infection a montré que la mutation du consensus de ce dernier affecte fortement la réplication virale <sup>248</sup>. En effet, en restituant un contexte optimal autour du codon AUG, le second cadre de lecture du segment PB1 qui permet l'expression de la protéine PB1-F2 n'était plus reconnu par le ribosome. De plus, le segment PB1 est moins bien incorporé dans la particule si les nucléotides autour du codon initiateur sont mutés. Cette étude de Wise suggère une dualité entre les séquences d'empaquetage et d'initiation de la traduction pour le segment PB1.

### 7.2.2 Les 5'UTR virales en contexte infectieux

En 1993, Garfinkel et Katze <sup>249</sup> ont infecté des cellules COS-1 par la souche WSN après avoir été préalablement transfectées avec des gènes rapporteurs de plusieurs types. Les premiers contiennent un gène rapporteur sous contrôle de la région 5'UTR du segment NP ou NS et le second contenant la séquence codante de



NP sous contrôle de la région 5'UTR du gène rapporteur SEAP. Les données de Northernblot montrent que les ARNm transfectés sont tous présents dans les cellules infectées mais seuls les ARNm qui contiennent une 5'UTR virale sont correctement traduits. Les auteurs en conclut que les 5'UTR virales sont des séquences *cis*-régulatrices de la traduction en condition d'infection par le virus de l'Influenza A. Cependant, ces observations ont été ensuite réfutées par les expériences de Cassetti et collègues en 2001<sup>250</sup> qui n'observaient pas, d'effet spécifique des 5'UTR virales sur la traduction. A juste titre, Cassetti remarque que les conditions expérimentales de Garfinkel sont critiquables vis-à-vis des perturbations nucléaires qu'induit le virus en bloquant l'export et l'expression des ARNm cellulaires. Elle choisit donc de travailler avec des ARNm chimères transcrits *in vitro* puis transfectés en cellules Hela infectées pour contourner les éventuelles inhibitions nucléaires durant l'infection. Les résultats expérimentaux montrent que le gène rapporteur codant pour la luciférase n'est pas mieux traduit s'il possède la 5'UTR de NP ou la 5'UTR de la  $\beta$ -globine contrôle<sup>250</sup>.

### **7.3 Rôle des facteurs *trans***

L'initiation de la traduction requiert 13 facteurs canoniques décrits dans le premier chapitre qui vont permettre l'arrimage et le positionnement du ribosome au niveau du site d'initiation de l'ARNm. On peut donc s'interroger si le virus Influenza a besoin de recruter l'ensemble de ces facteurs, ou seulement une fraction d'entre eux, pour assurer la synthèse de ses protéines virales.

#### **7.3.1 Les facteurs canoniques et l'initiation de la traduction pour l'Influenza A**

Les études qui s'intéressent aux facteurs d'initiation requis lors de l'infection, se sont principalement focalisées sur le complexe eIF4F. L'utilisation de drogues comme l'hippuristanol, un inhibiteur de eIF4A ainsi que des mutants ciblant l'activité



hélicase de eIF4A ont permis de montrer *in vitro* et *in cellulo* que l'expression des protéines virales requiert ce facteur d'initiation <sup>251</sup>. Ainsi, bien que les 5'UTR virales soient courtes et non structurées, elles nécessitent une activité hélicase ATP dépendante pour recruter correctement le ribosome sur l'ARNm et assurer son déplacement jusqu'au codon d'initiation. Dans une autre étude, Yanguéz et collègues <sup>252</sup> montrent que le clivage de eIF4G *in vitro* par la protéase L du FMDV et l'inhibition par ARN interférence de eIF4G diminuent l'efficacité traductionnelle des ARNm viraux, ce qui va dans le sens des résultats obtenus lors de la co-infection Influenza/poliovirus <sup>246</sup>. Cependant, le complexe eIF4F ne semble pas indispensable dans sa totalité comme le suggère la co-infection Influenza/adénovirus <sup>247</sup> et des expériences d'ARN interférence dirigée contre eIF4E ont permis de montrer que les ARNm viraux de l'Influenza A traduisent bien lorsqu'eIF4E est peu abondant <sup>253</sup>. Il semblerait donc que la traduction des ARNm viraux de l'Influenza A puisse être relativement indépendante d'eIF4E bien que ce point ne soit pas totalement élucidé.

### 7.3.2 Intervention du facteur cellulaire GRSF1

D'autres facteurs cellulaires pourraient faciliter la traduction virale. Ainsi, des études sur les 5'UTR des ARNm codant pour les protéines NS1 et NP ont montré que la protéine cellulaire GRSF1 (G-rich sequence factor 1) connue pour être un ITAF impliqué dans la régulation de la traduction des IRES cellulaires <sup>124</sup>, se lie à une région spécifique de la 5'UTR des ARNm viraux appelée A-box (de séquence AGGU, AGGGU ou AGGGGU) et stimule spécifiquement la traduction de ces ARNm <sup>254-258</sup>. Cette stimulation serait perdue si la région UNI12 de l'ARNm qui contient une partie de la A-box est déléetée. Cependant, Les travaux de Casseti et collègues tempèrent ce résultat en montrant que la simple inversion d'UNI12 qui induit la perte de la A-box dans la 5'UTR de NP n'a pas d'effet sur la traduction du gène rapporteur <sup>250</sup>.



### 7.3.3 La protéine PB2 : de la reconnaissance de la coiffe à la substitution de eIF4E ?

L'équipe de Nieto s'est particulièrement intéressée au rôle de eIF4E dans la traduction des ARNm viraux et montre, *in vitro*, que ceux-ci sont dépendants de eIF4E en utilisant la protéine 4EBP1 purifiée <sup>252</sup>. Cette contradiction avec les résultats de Burgui et Feigenblum qui suggéraient une relative indépendance par rapport à eIF4E s'expliquerait par le fait qu'un facteur viral (absent *in vitro*) pourrait se substituer à eIF4E. Ainsi, la protéine PB2 qui reconnaît la coiffe des ARNm cellulaires et permet le capsntatching par le complexe polymérase viral pourrait être une bonne candidate pour cette fonction <sup>259</sup>. En réalisant des expériences de co-immunoprécipitation Yanguéz et collègues ont montré que le domaine carboxy-terminal (C-ter) de PB2 interagissait avec eIF4G au niveau de la région PB2(538-693) <sup>252</sup>. L'utilisation de peptides issus de eIF4G a également permis de définir deux domaines de liaison de la PB2 recombinante au niveau des domaines eIF4G(664-681 et 1114-1131) <sup>252</sup>.

En parallèle, Bier et collègues ont comparé les facteurs qui se lient aux ARNm viraux de ceux qui se lient aux ARNc et ARNv et ont montré que la PABP1 et eIF4E ainsi que d'autres protéines s'associent à l'ARNm viral en condition d'infection mais pas aux ARNc et ARNv <sup>260</sup>. Précisons que l'équipe Nieto a travaillé avec la souche Victoria alors que celle de Bier utilisait la souche WSN. Au vu des données actuelles, il n'est donc pas possible d'attribuer une fonction claire de PB2 dans l'initiation de la traduction ni de définir l'interaction nette entre cette sous-unité de la polymérase virale et les éléments qui interviennent dans la traduction.





### 7.3.4 La protéine NS1 : une fonction importante dans la traduction

La protéine virale NS1 est une protéine de liaison à l'ARN <sup>225,226</sup> qui reconnaît spécifiquement les régions 5'UTR de NP et M sans qu'un motif nucléotidique particulier ne soit impliqué <sup>261-263</sup>. Par ailleurs, l'équipe de Nieto a montré que NS1 a la capacité de se fixer sur PABPI et la liaison est assurée par le domaine N-ter NS1(1-81). Selon ces travaux, le domaine NS1(81-113) s'associerait également avec eIF4G(157-550) pour former un complexe hétérotrimérique PABP-NS1-eIF4G <sup>231,261</sup>.

D'un point de vue fonctionnel, il a été montré que la transfection d'un vecteur d'expression de NS1 stimule la traduction des ARNm viraux sans affecter l'expression des ARNm non viraux. Cependant, il est à noter que dans cette étude, l'expression du gène rapporteur CAT se trouvait fortement stimulée ce qui contredit leur hypothèse initiale d'une stimulation virale spécifique <sup>262,263</sup>. Au-delà de cette contradiction, une autre équipe a montré que NS1 pouvait stimuler la traduction d'un gène rapporteur de type luciférase qui ne possède aucune séquence commune avec les gènes viraux <sup>264</sup>. Cela semble donc plutôt suggérer que NS1 agisse en tant que protéine stimulatrice de la traduction en général.

Le domaine minimal assurant la fonction de NS1 dans la traduction est NS1(1-113) pour la souche Victoria <sup>237</sup>, NS1(1-99) pour la souche PR8 <sup>262</sup> et NS1(1-74) pour la souche A/chicken/Nigeria/OG10/2007(H5N1) <sup>264</sup>. L'étude de mutations de NS1 montre que la perte de liaison à l'ARN par la double mutation R38AK41A (RK/AA) entraîne une perte de stimulation de la traduction pour la souche Victoria <sup>237</sup> et A/Luxembourg/43/2009(H1N1) <sup>264</sup> alors que la NS1 des souches A/chicken/Nigeria/OG10/2007(H5N1) très pathogène et A/Spur-winged-goose/Nigeria/210/2008(H5N2) peu pathogène mutée (RK/AA) conserve sa fonction

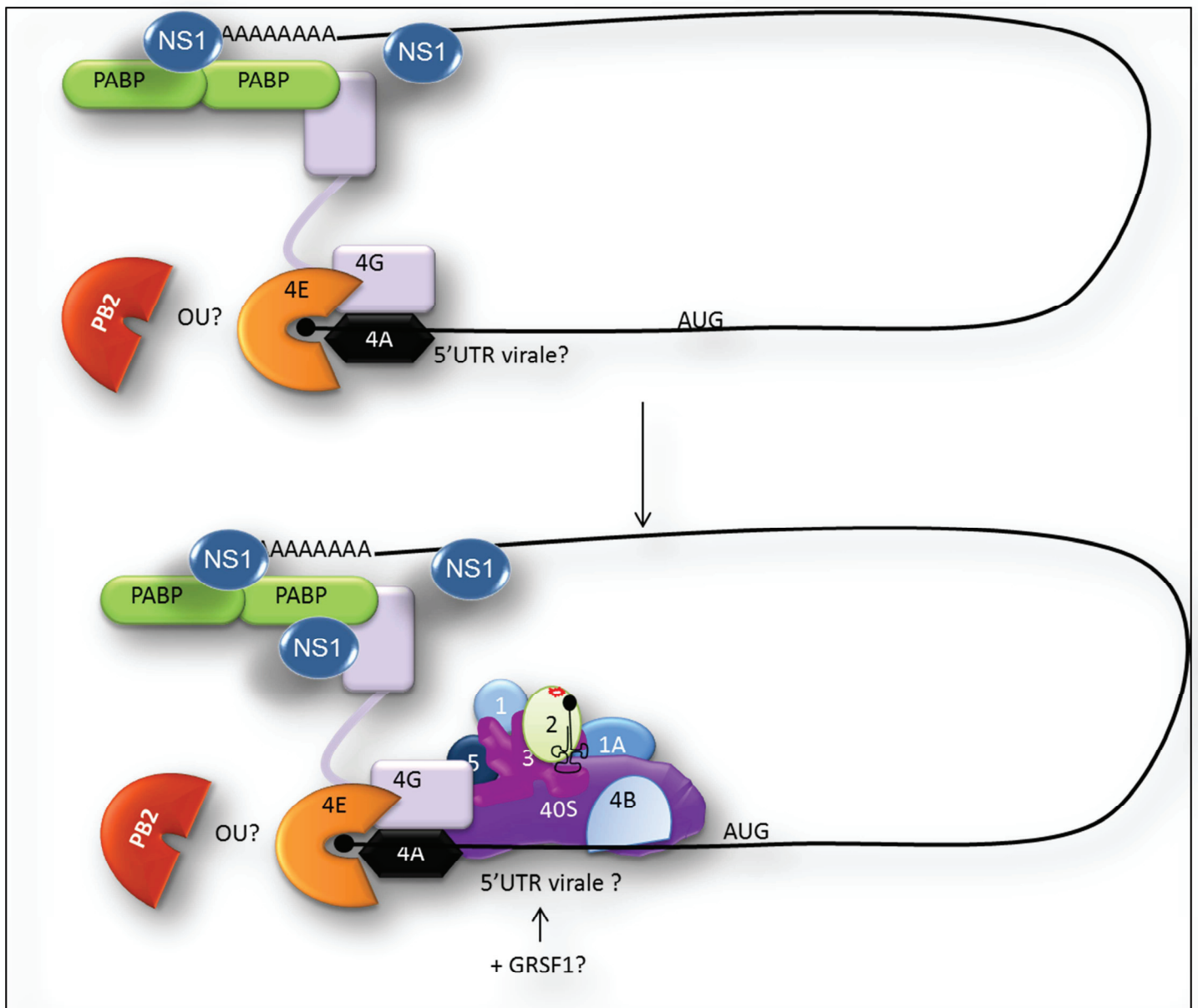


Figure 36: *Modèle d'initiation de la traduction virale*

Le facteur eIF4E serait remplacé par la sous-unité PB2 de la polymérase virale et la protéine NS1 faciliterait le recrutement de eIF4F par son interaction avec l'ARNm, PABP et eIF4G. Des protéines cellulaires pourraient également intervenir spécifiquement comme GRSF1 qui lie le domaine A-box des 5'UTR virales.

mais est affectée si quatre acides aminés additionnels (25, 26, 48 et 67) sont modifiés sur NS1<sup>264</sup>. Ces études suggèrent donc que la fonction de NS1 dans la stimulation de la traduction est intimement liée à la présence et à la structure de son domaine amino-terminal (1-73) qui est la zone privilégiée d'interaction avec les acides ribonucléiques viraux et cellulaires. Dans la figure 36, nous proposons un modèle d'initiation de la traduction des ARNm viraux qui résume les différents intervenants précédemment décrits.

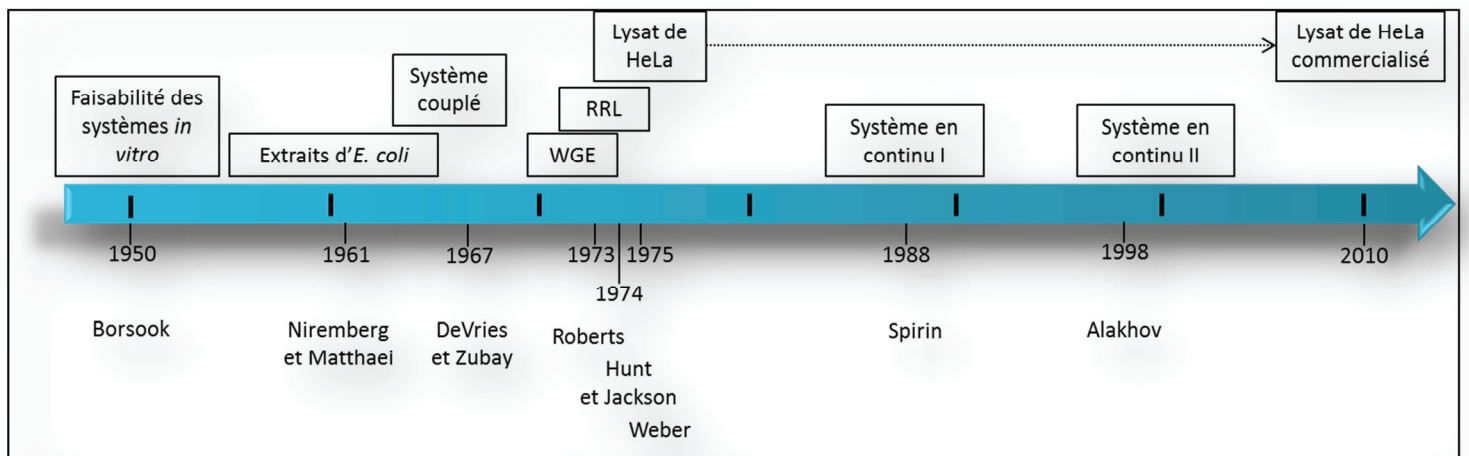


Figure 37: *Frise chronologique du développement des systèmes de traduction in vitro*

Evolution des systèmes *in vitro* sur les 60 dernières années et leurs inventeurs.

# Chapitre III: Les systèmes *in vitro*

Les systèmes de traduction *in vitro* sont actuellement principalement utilisés pour produire des protéines (essentiellement en vue de leur caractérisation) ou pour étudier les mécanismes de la traduction. Ces deux applications ont largement évolué et divergé au cours des cinquante dernières années. Alors que les systèmes de production ont surtout été optimisés au niveau des rendements, des systèmes d'analyse *in vitro* de la traduction ont été développés afin de reproduire la spécificité cellulaire (mais souvent au détriment du rendement). Ce chapitre se concentre principalement sur les systèmes *in vitro* permettant l'étude de la traduction et tente de les replacer dans un cadre plus général concernant les différentes techniques actuellement disponibles en biologie moléculaire pour permettre l'étude des mécanismes traductionnels.

## 1 Principe des systèmes acellulaires

### 1.1 Historique et généralités

En 1950, Borsook montre la faisabilité des systèmes d'expression *in vitro*. En réalisant un extrait cellulaire qui élimine la membrane cellulaire et qui utilise des acides aminés radiomarqués, il montre un taux d'expression comparable pour des ARNm cellulaires *in vivo* et *in vitro* (figure 37). Une décennie plus tard, le développement des techniques de biologie moléculaire permet d'utiliser des polynucléotides, transcrit *in vitro*, qui sont traduits dans un lysat d'*E. Coli* ou extrait S30<sup>265-267</sup>. Les premiers systèmes *in vitro* eucaryotes ont été développés bien plus tard avec l'utilisation d'extraits de germe de blé en 1973<sup>268</sup> puis le lysat de réticulocyte de lapin développé en 1974<sup>269</sup>. La frise chronologique résume les

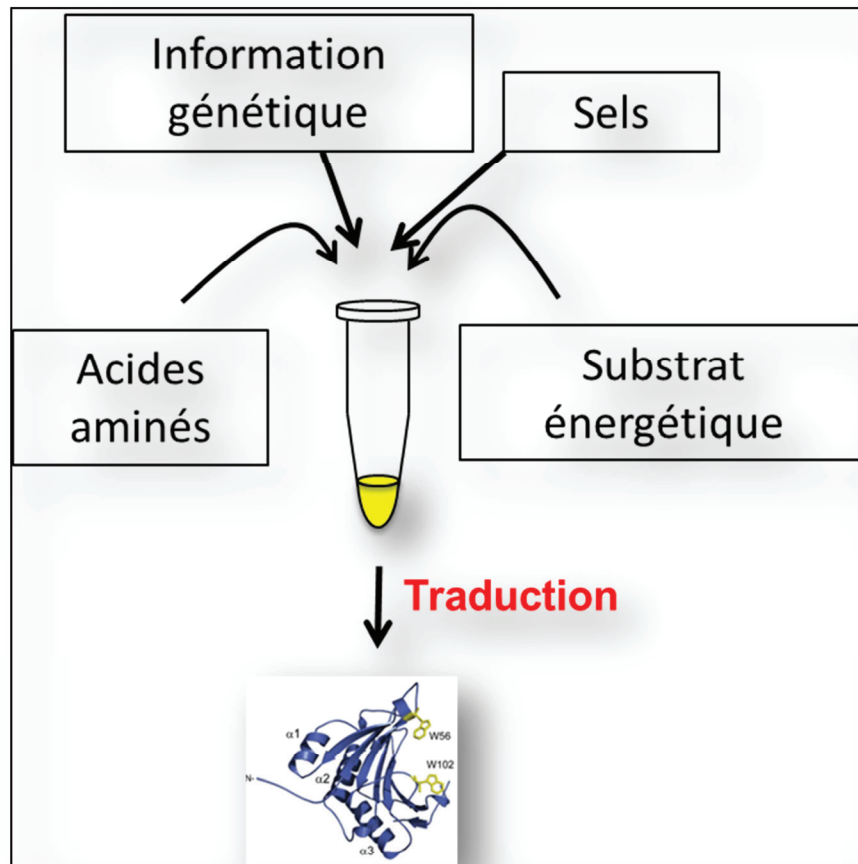


Figure 38: *Principe des extraits cellulaires*

Les cellules sont lysées de manière mécanique et par choc osmotique en évitant tout détergeant pour conserver les interactions au sein du cytoplasme et donc sa fonctionnalité pour la traduction. Plusieurs centrifugations permettent de débarrasser le lysat primaire de ses débris membranaires, ADN et organites. L'extrait cellulaire est ensuite complété en différents substrats pour traduire de manière optimale.

principales découvertes sur les systèmes *in vitro*. Le lysat d'*E. Coli* est le système qui a connu le plus d'innovations techniques dont certaines ont pu être appliquées aux systèmes eucaryotes comme la première utilisation d'ARN polymérase exogène en 1975 pour produire un ARNm à partir d'un ADN donné <sup>270</sup>. D'autres innovations qui améliorent le rendement de production protéique ont été développées grâce à l'utilisation de systèmes couplant transcription-traduction <sup>271</sup> ou encore les systèmes d'échange en continu qui permettent de régénérer les systèmes en facteurs limitants <sup>272,273</sup>. Récemment, de nombreuses données ont montré qu'un ARNm transcrit en cellule est associé à de nombreuses protéines et constitue une particule ribonucléoprotéique (RNPm) <sup>274</sup>. Ces protéines jouent sur la stabilité, l'export et sur la régulation de la traduction <sup>274</sup>. De fait, aucun des systèmes *in vitro* décrit ci-dessus ne permet de récapituler l'effet de ces RNPm sur la traduction d'un ARNm transcrit *in vitro*.

## 1.2 Concept et intérêt de ces systèmes

Si les systèmes de traduction *in vitro* connaissent une évolution constante, c'est parce qu'il est aisé d'entrevoir leur énorme potentiel et les applications qui en découlent. Ces méthodes peuvent être utilisées pour produire une protéine biologiquement active mais ils permettent surtout dans notre intérêt d'utiliser des outils de biochimie pour explorer les mécanismes liés à la synthèse des protéines. Par exemple, les systèmes *in vitro* permettent d'étudier l'effet de drogues et de molécules qui peuvent être ajoutées facilement aux extraits pendant les étapes de synthèse, ce qui est beaucoup moins facile *in cellulo*, à cause de la barrière que représente la membrane plasmique. De plus les études en cellule, et *a fortiori* sur l'organisme entier, peuvent être affectées par des réactions cellulaires globales, ou physiologiques, sans lien direct avec la voie ou le métabolisme étudié, ainsi dans les





cellules, l'apport de molécules exogènes peut provoquer un état de stress qui affecte son métabolisme, ses voies de signalisation voire l'intégrité cellulaire. Par exemple, il est difficile d'étudier des mutants de la voie mTOR car ils ne sont pas viables <sup>275</sup> et donc difficilement exploitables en système cellulaire et animal pour étudier leur impact sur la traduction. De même, l'étude de sous populations de ribosomes au sein d'une cellule reste un défi que seuls les systèmes *in vitro* pourraient permettre de relever <sup>106</sup>. Enfin, les cellules primaires ne se maintiennent pas très longtemps en culture, et nécessitent des conditions de culture particulières dont la mise au point est souvent laborieuse. Ces cellules se transfectent difficilement <sup>276</sup> et les biologistes ont souvent recourt à une étude sur des lignées immortalisées ou cancéreuses proche du type cellulaire d'intérêt. C'est le cas des études sur le virus de l'Influenza A dont la réplication est généralement étudiée sur des cellules A549, lignée de cellules cancéreuses de l'épithélium pulmonaire. La cellule est donc par sa complexité et ses voies de signalisation interconnectées, un outil de recherche bien souvent trop intégré, et peu adapté à une démarche qui au départ doit être souvent très réductionniste. *A contrario*, les systèmes *in vitro* sont des systèmes ouverts dans lesquels il est aisé de modifier les paramètres biochimiques, et, ou, moléculaires, ce qui explique leurs succès dans l'étude des grands mécanismes liés à l'expression des gènes, et, en particulier à l'étude des phénomènes traductionnels. Ainsi on peut jouer sur des paramètres comme la concentration en sel, la température, l'ajout de drogues qui affectent la traduction, la déplétion/l'apport de protéines/ARN susceptibles d'intervenir dans les régulations traductionnelles (figure 38). Et l'on pourrait aussi envisager la mise au point de systèmes capables de reproduire les propriétés de sous fractions cytoplasmiques.

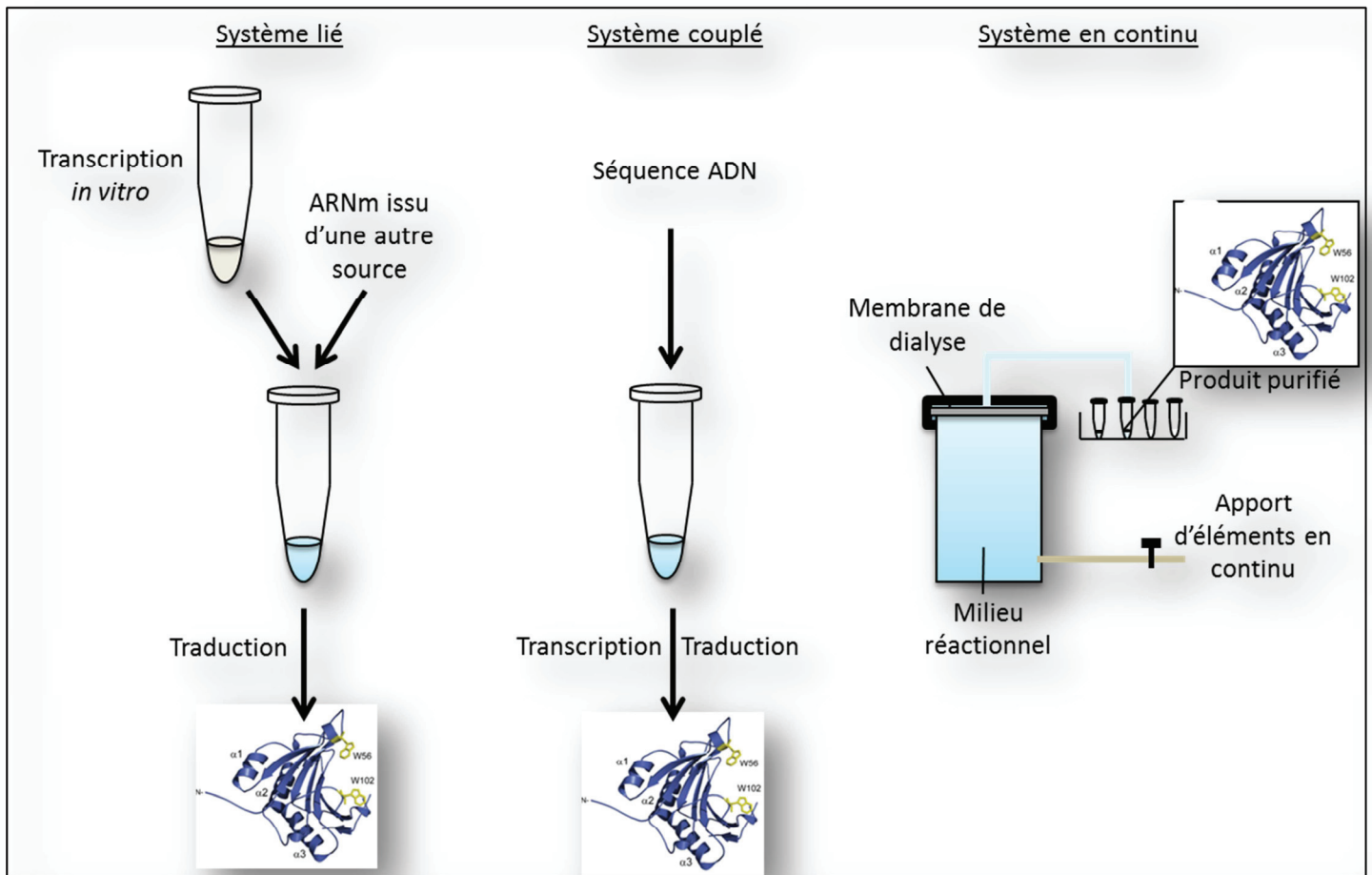


Figure 39: *Les différents systèmes in vitro*

Les systèmes liés nécessitent de préalablement transcrire un ARNm alors que les systèmes couplés contiennent des polymérases additionnelles au lysat qui permettent de coupler transcription et traduction dans l'échantillon. Les systèmes en continu, uniquement utilisés avec des extraits de cellules bactériennes permettent de collecter la protéine d'intérêt au travers d'une membrane de dialyse et d'apporter en continu les éléments indispensables à la traduction.

### 1.3 Les différents systèmes

Chaque système est défini en fonction de l'origine de l'extrait cellulaire ainsi que la technique de production des protéines (figure 39).

- (i) Les systèmes traductionnels liés sont des systèmes qui nécessitent de transcrire préalablement *in vitro* les ARNm à l'aide des ARN polymérase SP6, T3 ou T7 de bactériophages <sup>277</sup>. Le lysat de réticulocyte de lapin (RRL) est le plus couramment utilisé ainsi que les extraits de germe de blé (WGE) et, plus récemment, le lysat de cellules Hela.
- (ii) Les systèmes couplés transcription/traduction, aussi appelés systèmes combinés, regroupent ces deux étapes dans une même réaction. Pour ce faire, l'ARN polymérase d'un bactériophage est ajoutée au système et transcrit les gènes qui possèdent un promoteur spécifique en amont. En général, ces systèmes utilisent des lysats procaryotes mais il existe également des systèmes eucaryotes couplés commercialisés qui utilisent du RRL, du WGE et plus récemment le lysat de cellules Hela dont le rendement serait amélioré de deux à six fois.
- (iii) Enfin les systèmes de traduction en continu ont été développés principalement pour augmenter les rendements de production protéique. Ces systèmes utilisent des extraits d'*E. Coli* placés dans différents réacteurs qui permettent un apport continu d'énergies et de substrats indispensables à la traduction <sup>278</sup>. Nous ne nous attarderons pas dans ce chapitre à présenter les systèmes couplés



et continus car leur optimisation pour la production protéique les rend sans intérêt pour l'étude du mécanisme de la traduction.

Les systèmes liés sont couramment utilisés dans notre laboratoire pour appréhender les mécanismes moléculaires qui contrôlent la traduction.

## **2 Les différents lysats cellulaires et leurs limites**

En théorie, n'importe quel extrait cellulaire débarrassé de ses membranes et organites peut constituer un système d'étude de la traduction *in vitro*. Néanmoins, si beaucoup sont décrits dans la littérature scientifique, très peu de ces extraits cellulaires sont utilisés et encore bien moins sont commercialisés. La régulation de la traduction peut être étudiée par radiomarquage des protéines exprimées ou par l'utilisation de gènes rapporteurs tels que les luciférases, des protéines fluorescentes (GFP) ou des enzymes (CAT). En revanche, des extraits cellulaires restent souvent peu efficaces avec un taux de production bien inférieur à celui observé dans le RRL ou le WGE d'après nos résultats expérimentaux. Les raisons de cette faible efficacité restent multiples et peu connues. D'éventuelles contaminations ADN, protéiques, protéases et RNases, ou encore la libération d'un excès de sels lors de la lyse cellulaire ce qui induit une faible reproductivité des systèmes associée à une faible production de protéines d'intérêt. De plus, la préparation des lysats cellulaires est une technique laborieuse, difficilement applicable à l'échelle industrielle et il existe actuellement seulement quatre lysats cellulaires commercialisés qui sont décrits ci-dessous.

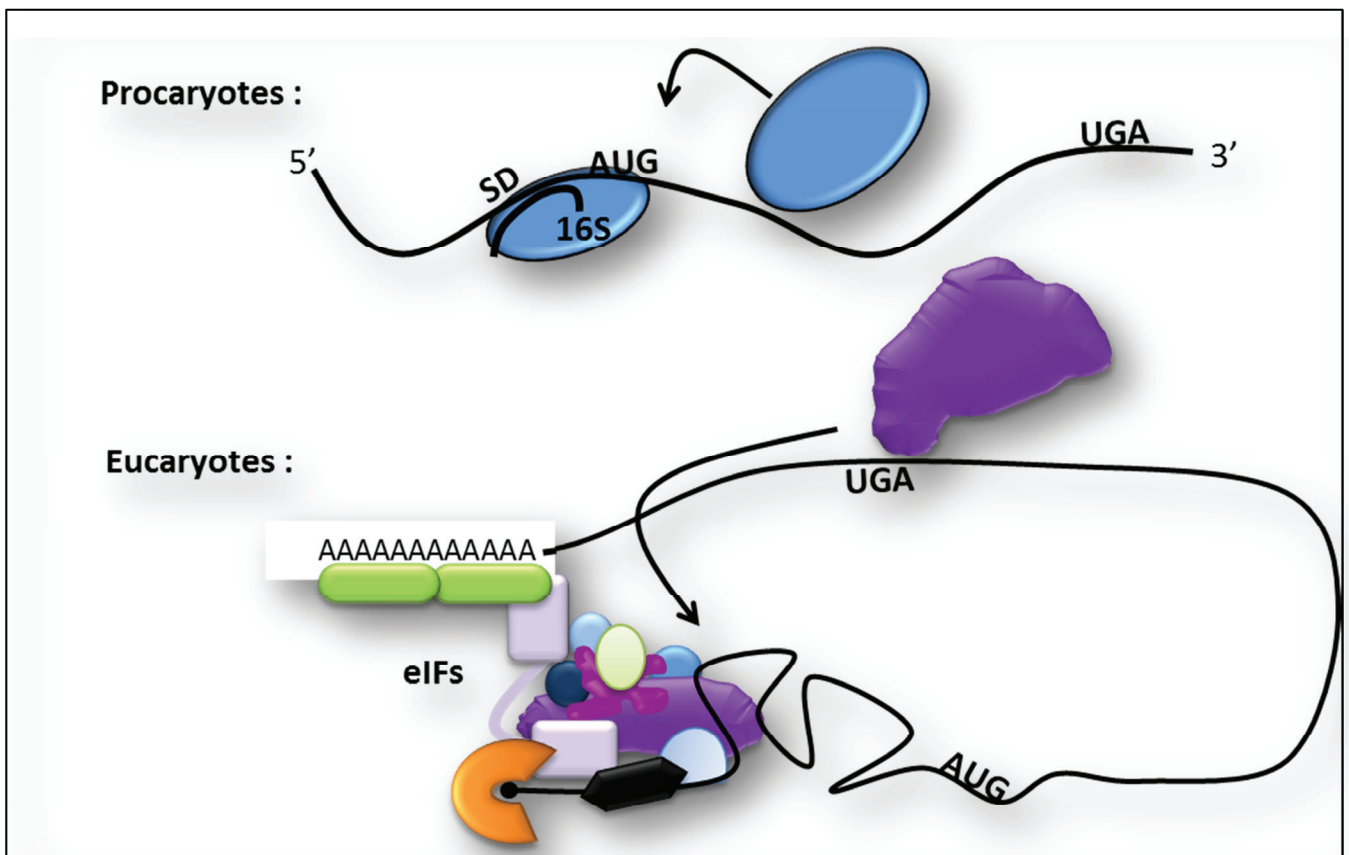


Figure 40: *Comparaison de la traduction procaryote et eucaryote*

Initiation de la traduction procaryote où la petite sous-unité ribosomale est directement recrutée à l'AUG initiateur par une complémentarité entre l'ARNr 16S et la séquence Shine-Dalgarno (SD) de l'ARNm et initiation de la traduction eucaryote qui requiert plusieurs facteurs canoniques (eIFs) et un ARNm coiffé et poly-adénylé (Chapitre I).

## 2.1 Le lysat d'*Escherichia coli*

*Escherichia coli* est un bacille gram négatif retrouvé principalement dans le tractus intestinal des mammifères qui a été identifié la première fois par Theodor Escherich en 1885. C'est un modèle d'étude cellulaire et un outil de biotechnologie facilement accessible car il est aisément cultivable. Le premier système *in vitro* développé par Nirenberg <sup>279</sup> était constitué d'un extrait de ce bacille et c'est aujourd'hui le système *in vitro* le plus utilisé pour la production des protéines car il offre un très bon rendement <sup>280</sup>. La préparation de ce lysat consiste à travailler avec la fraction S30 <sup>281</sup> qui est un extrait cellulaire dont l'information génétique (ADN et ARNm) endogène a été éliminée. Ce système a été fort utile, à la fois pour l'industrie, et pour la recherche, il présente cependant des limitations.

Ainsi comme pour tout système procaryote, il ne permet pas de réaliser une étude analytique de la traduction à un niveau eucaryote car les mécanismes de recrutement des ribosomes à l'ARNm et les éléments impliqués sont différents pour ces deux grandes familles du vivant (figure 40). De plus, les modifications post-traductionnelles des protéines sont soit inexistantes <sup>281</sup>, soit différentes de celles que l'on peut trouver chez les eucaryotes. Par ailleurs, les repliements de la chaîne polypeptidique en cours de synthèse peuvent être différents entre traduction procaryote et eucaryote ce qui peut affecter la fonctionnalité des protéines produites, ou leurs propriétés antigéniques. Cette différence de repliement est en partie due à la vitesse de synthèse différente chez les procaryotes mais également à des protéines chaperonnes différentes qui assistent le repliement de la protéine néosynthétisée <sup>280</sup>. Le S30 d'*E. coli* est aujourd'hui commercialisé par de nombreuses entreprises : Giagen, Promega, Invitrogen, Thermo scientific et Roche





Figure 41: *Préparation des extraits de germe de blé (adapté de Endo 2003<sup>282</sup>)*

Le caryopse de blé est débarrassé de sa cuticule et de son endosperme. Cette première étape donne un grain encore riche en nucléases et inhibiteurs de traduction qui sont éliminés par lavage. Le grain est finalement broyé.

diagnostics qui assurent des rendements de plus de 10µg de protéine d'intérêt par traduction pendant 1 heure dans un volume réactionnel de 10µL <sup>283</sup>.

## 2.2 Les extraits de germe de blé

En 1973, Roberts <sup>268</sup> décrit comment produire du lysat d'embryon de blé et montre que les protéines produites dans ce système migrent à la même hauteur que les protéines natives sur un gel SDS-PAGE ce qui suggère que les protéines produites *de novo* en extrait de germe de blé (WGE) peuvent être modifiées traductionnellement. La force de ce système *in vitro* réside donc dans sa capacité à produire des protéines qui conservent leur fonction biologique et c'est probablement le système *in vitro* eucaryote le plus performant en coût et en production de protéines à l'heure actuelle <sup>280,284,285</sup>. Cependant, les extraits primaires de germe de blé contiennent des inhibiteurs traductionnels comme des N-glycosidases, des ribonucléases et des protéases issues de l'endosperme qui sont éliminés par un lavage des embryons et le retrait complet de l'endosperme du fruit <sup>282</sup> (figure 41). Le produit finalisé commercialisé par Roche diagnostics, Promega et Cellfree sciences & Co est supplémenté avec un système générant de l'énergie composé du couple phosphocréatine-phosphocréatine kinase, de la spermidine pour stimuler l'élongation et ainsi prévenir d'une terminaison prématurée et de l'acétate de magnésium. Les kits commerciaux de WGE contiennent également des acides aminés pour augmenter le taux de production protéique et de l'acétate de potassium. Malgré un rendement de 0,2 à 5µg de protéines produites après 1h30 pour 10µL d'extrait <sup>285</sup>, qui est donc inférieur au lysat d'*E. coli*, le WGE offre de nombreuses applications, notamment pour le criblage haut débit des protéines eucaryotes.

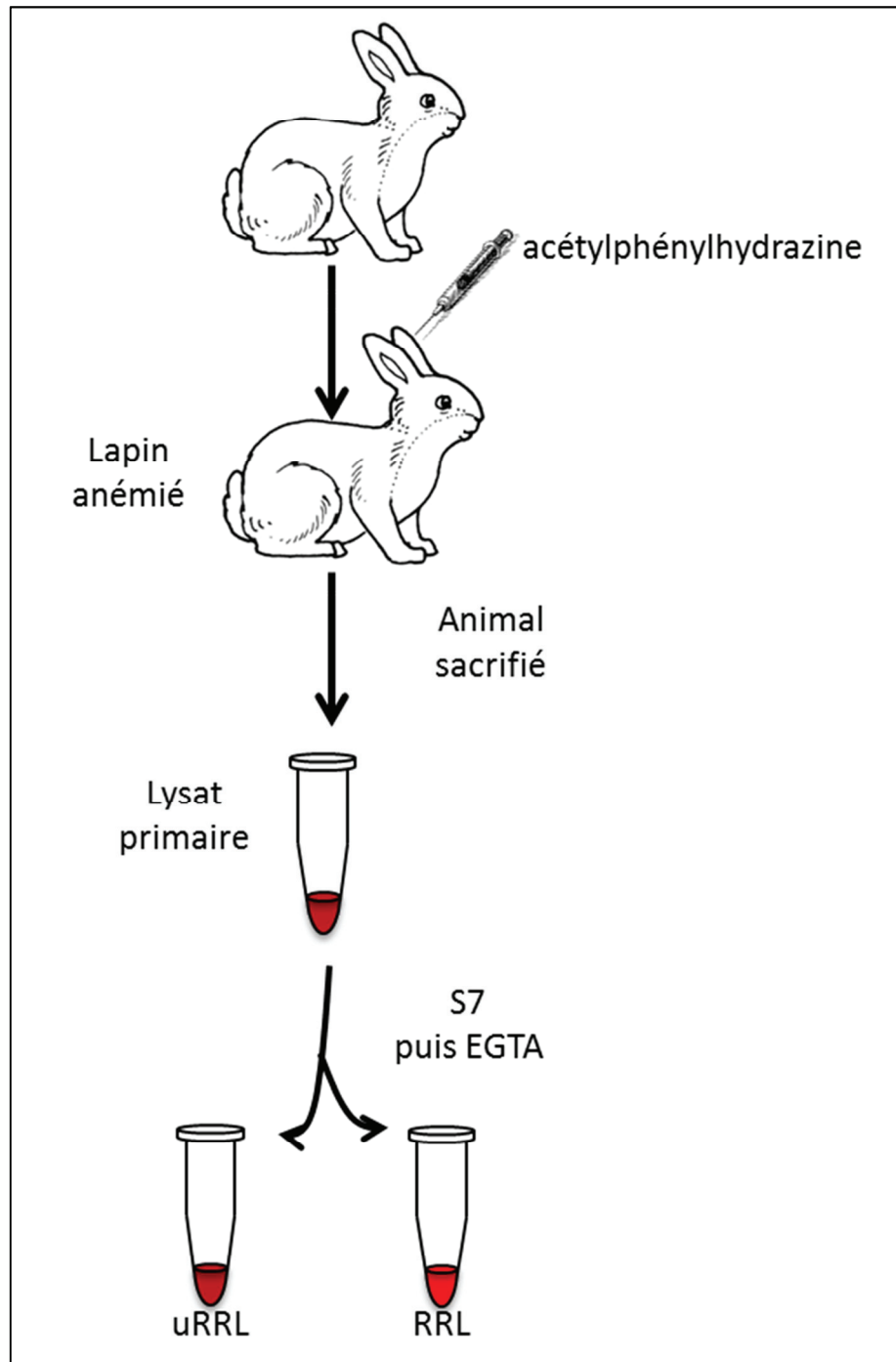


Figure 42: *Préparation du lysat de réticulocyte de lapin (RRL)*

Le lapin est anémié puis sacrifié pour collecter le sang enrichi en réticulocytes. Le lysat est obtenu par choc osmotique puis débarrassé de ses débris cellulaires après plusieurs centrifugations. Il est ensuite utilisé tel quel après avoir été supplémenté en molécules énergétiques, sels, acides aminés, ARNt... (uRRL) ou est traité à la nucléase micrococcalle S7 pour être débarrassé de ses ARNm endogènes (RRL).

### 2.3 Le lysat de réticulocyte de lapin

Le lysat de réticulocyte de lapin (RRL) est le système le plus utilisé pour l'étude des mécanismes traductionnels. Il a été mis au point par Hunt et Jackson en 1974<sup>269</sup>. Sachant que l'une des raisons de la faible efficacité des lysats cellulaires classiques est due, entre autres, à des contaminations par de l'ADN, l'idée de génie de Hunt et Jackson, fut de partir de cellules spécialisées dans la traduction et ayant naturellement perdu leur ADN. Un tel système existe chez les Mammifères, et il est représenté par le réticulocyte, qui est la cellule précurseur de l'érythrocyte, et que l'on peut comparer à un sac (sans noyau) rempli de ribosomes prêt à traduire les ARNmessagers (essentiellement codant pour la globine) qui sont présents dans cette cellule. Certes les réticulocytes ne sont pas normalement accessibles, mais lors des anémies sévères ils peuvent passer de la moelle osseuse à la circulation générale. C'est ainsi qu'ils ont imaginé de préparer leur lysat à partir du sang de lapins préalablement anémiés par injection d'acétylphénylhydrazine qui est un oxydant de l'hémoglobine<sup>286</sup> (figure 42). Le sang de ces lapins enrichi en réticulocytes, cellules anucléées riches en ribosomes, est récupéré et les cellules sont lysées par choc osmotique. Tout comme dans les extraits de germe de blé, des maturations post-traductionnelles ont lieu dans ce système et permettent de produire des protéines qui conservent leur fonction biologique. Ainsi, contrairement au WGE dont la N-glycosylation n'est pas très efficace, le RRL assure pleinement cette fonction après ajout de membranes microsomales<sup>287,288</sup> et il a été montré que ce système permet d'ubiquitiner, phosphoryler, N-myristoyler, acétyler et isoprényler les protéines<sup>280,289–291</sup> (figure 43). Tempérons néanmoins les propriétés post-traductionnelles de ce lysat car il reste incapable de reproduire des maturations post-traductionnelles les plus complexes que l'on trouve notamment dans le golgi *cis* ou *trans*. Ce système

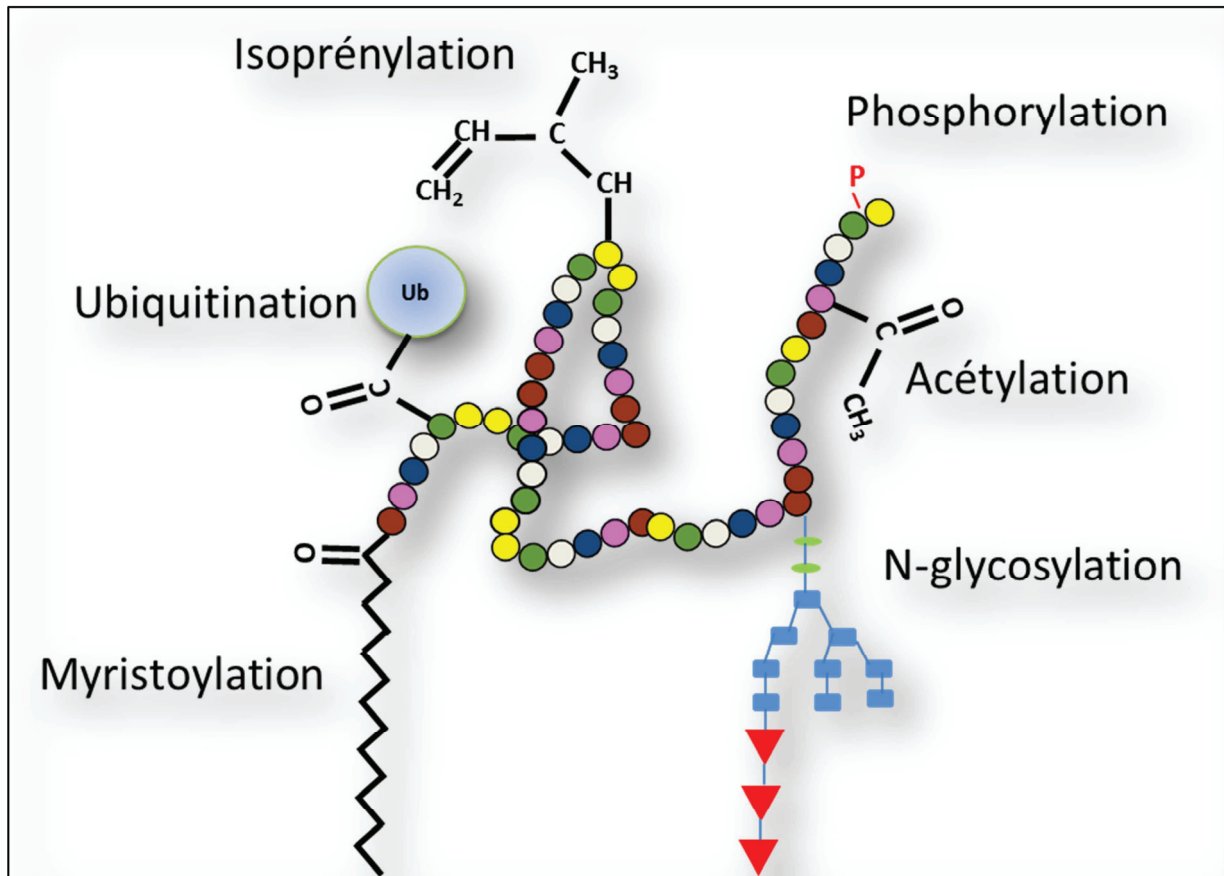


Figure 43: *Illustration des principales modifications post-traductionnelles*

Au cours de sa synthèse ou peu de temps après, le polypeptide peut être habillé de manière covalente par différents groupements de molécules qui modifient la fonction de la protéine.

actuellement commercialisé par Ambion et Promega, est supplémenté en hémine qui inhibe l'activation de la kinase d'eIF2 $\alpha$  HRI<sup>292</sup> (voir chapitre I régulation de la traduction), en phosphocréatine kinase et phosphocréatine qui permettent de générer de l'énergie indispensable à la traduction, en acides aminés et en ARNt issus de foie de veau pour améliorer le taux d'expression protéique. Ce système est ensuite optimisé pour chaque réaction par l'ajout de DDT qui inhibe d'éventuelles désoxyribonucléases et différentes concentrations en magnésium et en potassium. Le RRL est actuellement commercialisé sous deux conditionnements dont l'un est un extrait brut non traité, le uRRL (untreated RRL) et l'autre est traité à la nucléase micrococcalle (S7) (RRL) qui dégrade les deux principaux ARNm endogènes qui sont l'ARNm codant pour la  $\beta$ -globine et la lipoxigénase. Cette nucléase est ensuite bloquée avec de l'EGTA un chélateur d'ions calcium indispensables à l'activité de l'enzyme. L'absence de compétitivité avec des ARNm endogènes dans le lysat traité à la S7 assure de meilleurs rendements d'expression protéique qu'en lysat non traité (uRRL). Cependant, le traitement à la nucléase ne rend plus compte de la synergie coiffe et queue poly(A) des ARNm qui continuent de bien traduire même en absence d'une de ces deux régions *cis*-régulatrices et le RRL est donc moins physiologique que le uRRL<sup>293</sup>. Le taux de rendement avoisine les 1 à 10ng de protéines exprimées après 1 heure dans 10 $\mu$ L de RRL<sup>287,288</sup>.

## 2.4 Le lysat de cellules HeLa

La lignée cellulaire HeLa provient d'un prélèvement à partir de métastases effectué sur Henrietta Lacks, patiente atteinte d'un cancer du col de l'utérus et décédée en 1951. Ces cellules furent la première lignée immortelle d'origine humaine et sont couramment utilisées en biologie cellulaire comme modèle d'étude. Dès 1975, Weber et collègues montrent la fonctionnalité du lysat de cellules HeLa et

Type	Avantages	Inconvénients
<b>Extraits d'<i>E.coli</i></b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Simple à préparer</li> <li>2. Fort rendement</li> <li>3. Possible de réaliser des modifications génétiques</li> <li>4. Faible coût des sources énergétiques</li> <li>5. Faible coût</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Modifications post-traductionnelles très limitées</li> <li>2. Mécanisme procaryote différent</li> </ol>
<b>Extraits de germes de blé</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Expression eucaryote</li> <li>2. Bon rendement</li> <li>3. Couplé aux techniques de haut débit</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Extraction longue et complexe</li> <li>2. Pas de modifications génétiques en amont</li> </ol>
<b>Lysat de réticulocyte de lapin</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Rendement correct</li> <li>2. Expression Mammifère</li> <li>3. Outil couramment utilisé pour l'étude des mécanismes de traduction</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Manipulation de tissus animaux complexe</li> <li>2. Riche en ARNm endogènes compétiteurs</li> <li>3. Pas de modifications génétiques en amont</li> <li>4. Production insuffisante pour les études en cristallographie</li> <li>5. Coût élevé</li> </ol>
<b>Lysat de cellules HeLa</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Expression humaine</li> <li>2. Possibilité de réaliser des modifications génétiques en amont</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Faible rendement</li> <li>2. Peu reproductible si préparé en laboratoire</li> <li>3. Coût élevé du produit commercialisé</li> </ol>

Figure 44: *Avantages et inconvénients des différents systèmes de traduction in vitro*

Tableau qui résume les avantages et inconvénients des 4 systèmes *in vitro* commercialisés. Les techniques développées pour une meilleure productivité des protéines se traduisent inéluctablement par la perte de spécialisation de la machinerie traductionnelle et inversement.

précisent que de l'hémine ainsi que de l'énergie sous forme de GTP doivent être ajoutés pour stabiliser les ribosomes et permettre l'initiation de la traduction <sup>294</sup>, cependant ce lysat restera pendant longtemps produit ponctuellement en laboratoire. Il constitue le système *in vitro* lié (ou couplé) le plus récemment commercialisé par Pierce (depuis 2010) pour rendre compte de la forte demande en systèmes acellulaires. Les kits contiennent l'ensemble des éléments précédemment décrits (énergie, acides aminés, sels, inhibiteurs de nucléases) ainsi que des protéines accessoires dont la composition n'est pas dévoilée par Pierce. Ce système assure la production de 100ng de protéine après 1h30 à 6h d'incubation dans 10µL de lysat en utilisant un ARN issu du vecteur pT7CFE1 dont l'initiation de la traduction est assurée par l'IRES d'EMCV <sup>295</sup>. Ce système présente donc l'inconvénient d'être trop restrictif pour l'étude du mécanisme de traduction qui s'intéresse à des ARNm spécialisés et qui peuvent donc être moins bien traduits qu'en présence de l'IRES d'EMCV. Il a cependant l'avantage d'être plus reproductible que les lysats de cellules Hela produits en laboratoire <sup>296</sup>.

## 2.5 Les lysats non commercialisés

Le tableau en figure 44 résume les forces et faiblesses des principaux extraits cellulaires. Cependant, beaucoup d'autres lysats ont été développés en laboratoire mais n'ont pas fait l'objet de commercialisation car ils sont trop peu productifs, pas assez reproductibles ou ils nécessitent des techniques laborieuses pour les préparer. Citons le lysat de cellules d'insectes issus de *Spodoptera frugiperda* qui reproduit les modifications post-traductionnelles observées en RRL <sup>297,298</sup> mais qui ne requiert pas de membranes microsomales pour la glycosylation <sup>293</sup>. Cependant le développement de ce lysat reste limité car il est associé à un coût élevé pour la culture de ces cellules ce qui prend également beaucoup de temps. Des lysats de levures





*Saccharomyces cerevisiae* ont également été développés mais ils nécessitent beaucoup de savoir-faire pour dégrader la paroi de ce champignon unicellulaire sans perturber la fraction cytoplasmique<sup>299</sup>.

### **3 Un outil de recherche et de développement technologique**

#### **3.1 Des découvertes historiques**

En 1961, Marshall Nirenberg découvre que l'addition d'un acide désoxyribonucléique constitué uniquement d'uridine (U) dans un extrait d'*E. coli* suffit à synthétiser un polypeptide composé uniquement de phénylalanine. Puis grâce la méthode de synthèse d'un ARNm composé de différentes bases (A, U, G, C) inventée par Har Gobind Khorana, il devient possible d'établir la correspondance entre les 64 codons possibles ( $4^3$ ) et les 20 acides aminés universellement répandus dans le vivant. En 1966, le décryptage du code génétique est achevé et Nirenberg sera récompensé par le prix Nobel en 1968 (encyclopédie universelle).

Les systèmes *in vitro* ont également permis de découvrir et caractériser la fonction de l'ensemble des facteurs canoniques de l'initiation de la traduction (eIFs) durant les années 70-80<sup>68,77</sup>. Le RRL a été particulièrement utilisé car c'est un modèle d'étude important riche en eIFs ce qui permet, encore aujourd'hui, d'étudier les interactions fonctionnelles qui interviennent dans le mécanisme d'initiation de la traduction (chapitre I).

#### **3.2 Utilisation en recherche fondamentale**

##### **3.2.1 Avancées scientifiques qui s'appuient sur le RRL**

Le RRL a permis de nombreuses avancées sur la compréhension des mécanismes d'initiation ou de régulation de la traduction eucaryote et virale comme

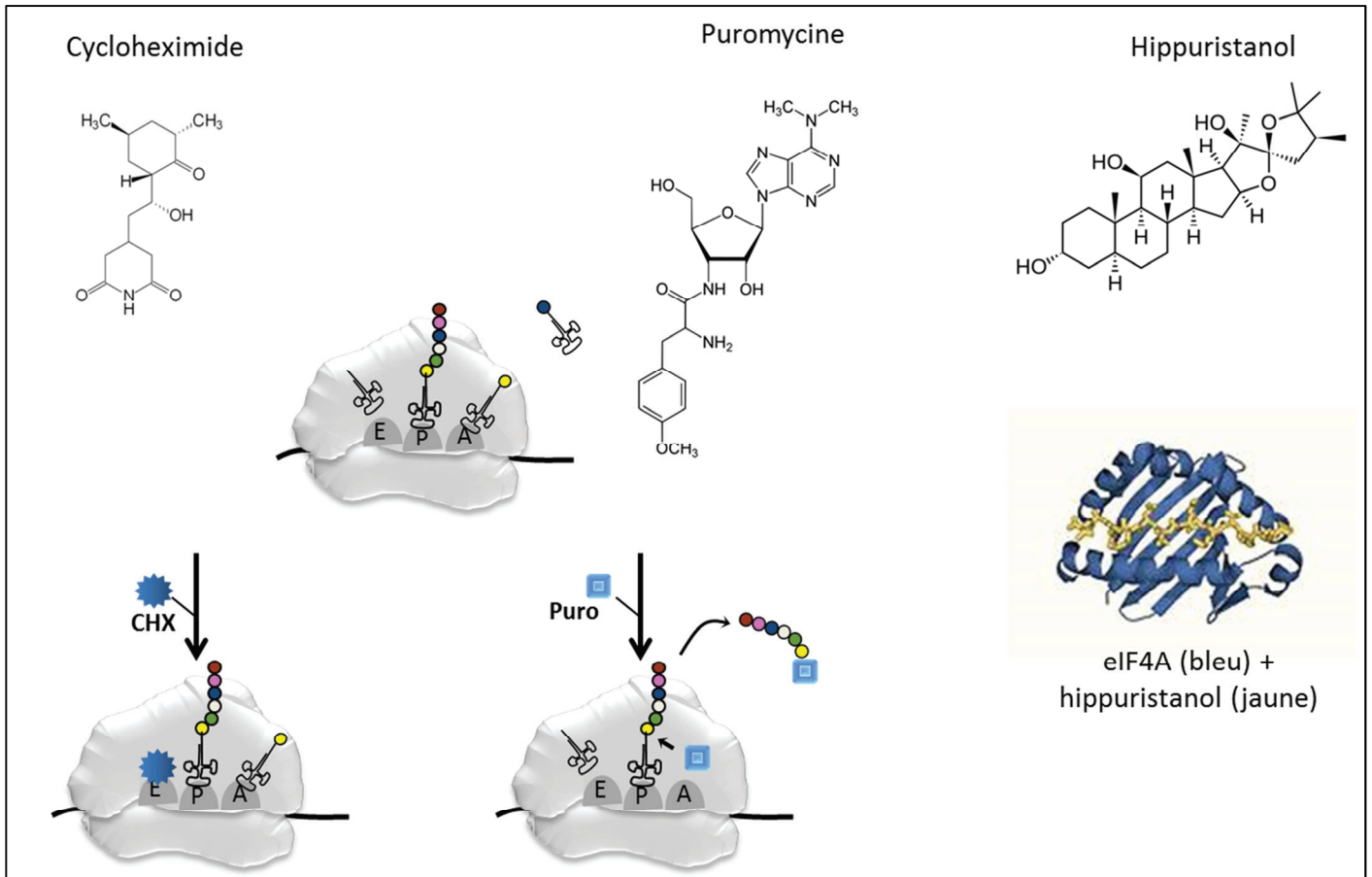


Figure 45: *Mode d'action des principales drogues agissant sur la traduction*

La cycloheximide interagit au niveau du site E du ribosome et le fige sur l'ARNm, empêchant la synthèse du polypeptide. La puromycine mime l'organisation des acides aminés et est ajoutée au polypeptide en cours de synthèse ce qui produit sa libération et la dissociation des deux sous-unités ribosomales de l'ARNm. L'hippuristanol s'insère dans le corps de l'hélicase eIF4A et inhibe sa fonction.

l'étude de l'IRES virale du poliovirus <sup>300</sup> ou encore celle du HIV <sup>119,301,302</sup>. Le RRL est également un outil adapté à l'étude des mécanismes qui régulent l'activité des micro ARNs (miARN) <sup>66,303</sup>. Ainsi, il a été montré que l'effet miARN est associé à la présence d'une queue poly(A) et est impliqué dans le balayage de la petite sous-unité ribosomale le long de la 5'UTR. Enfin le système reconstitué de Pestova et collègues <sup>86,117</sup> a permis de mettre en évidence le rôle de différents facteurs d'initiation de la traduction comme l'action synergique de eIF1 et eIF1A qui permettent la formation du complexe 48S au niveau du codon d'initiation <sup>84</sup>.

### **3.2.2 Des outils de biotechnologie adaptés au RRL**

#### **3.2.2.1 Les inhibiteurs de l'élongation**

La compréhension des mécanismes de la traduction passe par l'utilisation de divers drogues spécifiques qui a entraîné une course à la caractérisation de molécules inhibitrices <sup>304</sup>. De nombreuses drogues permettent ainsi de figer la traduction et étudier l'agencement des différents composants impliqués de même que leurs fonctions respectives (figure 45). La molécule de cycloheximide interagit avec grande sous-unité ribosomale au niveau de son site E et inhibe la translocation de l'ARNt du site P au site E <sup>305</sup>. L'effet est réversible et permet de fixer la position du ribosome en cours de traduction sur l'ARNm. Elle est donc utilisée lors de l'établissement de profils polysomaux.

La puromycine, un antibiotique dont la composition chimique a été établie en 1950 par Yarmolinsky et de la Haba, agit en tant qu'analogue du groupement aminoacyl-adenylyl des aminoacyl-ARNts. En se fixant au site A de la sous-unité 60S, elle induit une terminaison prématurée de la synthèse protéique ce qui entraîne la dissociation du ribosome à l'ARNm. Cet inhibiteur qui a l'avantage de lier



l'extrémité C-terminal du polypeptide néosynthétisé peut-être couplé à différents marqueurs qui serviront ensuite à purifier les polypeptides d'intérêt <sup>306</sup>.

### **3.2.2.2 Les inhibiteurs de l'initiation**

L'hippuristanol est une molécule extraite du corail *Isis hippuris* qui a la capacité d'inhiber spécifiquement l'activité de l'ARN hélicase eIF4A <sup>40</sup> (figure 45). Elle a ainsi permis de déterminer le mode d'initiation de l'IRES d'HCV qui est eIF4A indépendante <sup>40</sup>. Le cap-analogue (GpppG) qui titre eIF4E, de même que l'ajout de poly (rA) *in vitro* qui titre la PABPI peuvent permettre de déterminer le rôle de ces facteurs dans la traduction d'ARNm spécifiques. L'ensemble des protéines du lysat sont également accessibles vis-à-vis de facteurs ajoutés comme par exemple des protéases virales qui sont capables de cibler spécifiquement certaines des protéines impliquées dans l'initiation, ainsi la protéase L du FMDV ou la protéase 2a du PV (chapitre I) clivent eIF4G. Cette approche peut s'appliquer à de nombreuses protéines d'intérêt qui peuvent jouer un rôle dans la traduction et sont soit exprimées préalablement dans le système, soit ajoutées après purification en protéines recombinantes. Le système est aussi intéressant car il permet les approches de type déplétion spécifiques de certains facteurs.

## **3.3 Production de protéines...**

Les systèmes d'étude *in vitro* servent également à produire des protéines d'intérêt pour les biologistes moléculaires, les biotechnologistes et les pharmacologistes mais aussi à une fin de caractérisation par des structuralistes. Les principaux avantages de produire ces protéines dans un système acellulaire sont résumés ci-dessous.

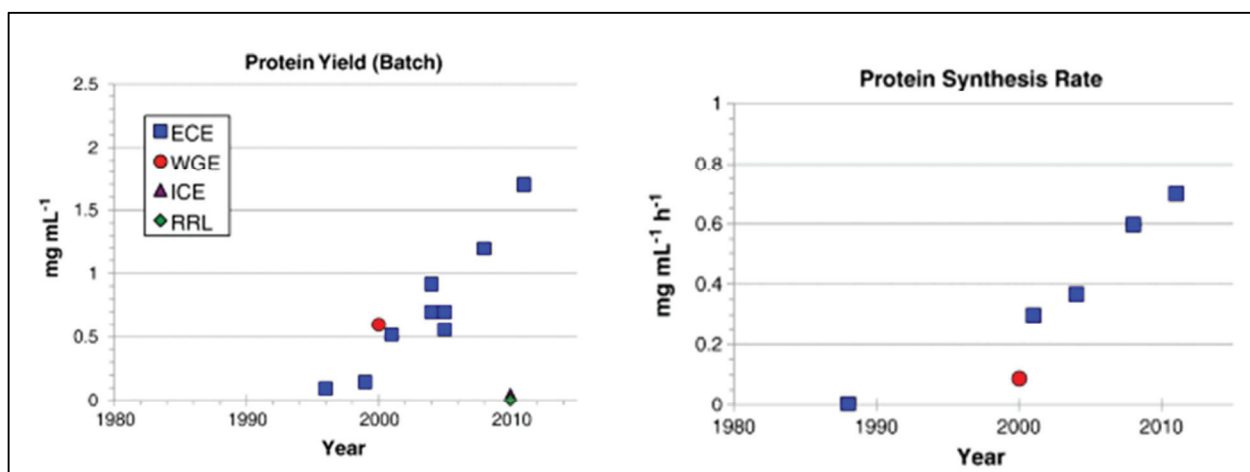


Figure 46: *Evolution de la productivité protéique des extraits cellulaires (d'après Carlson 2012<sup>280</sup>)*

Le seul lysat eucaryote capable de rivaliser aujourd'hui avec les extraits d'*E. coli* (ECE) est l'extrait de germe de blé (WGE). Les extraits de réticulocyte de lapin (RRL) ou de cellules d'insecte (ICE) n'ont pas un rendement suffisant pour une mise à l'échelle industrielle. Les rendements de production protéique en ECE ont ainsi été multipliés par 20 au cours des 20 dernières années grâce à l'optimisation des extraits et le développement des systèmes en continu.

### 3.3.1...rapidement

La production de protéines en cellules se compte en jours, du fait du temps que mettent les cellules à se multiplier et auquel s'associe le coût énergétique suite à la multiplication cellulaire et qui n'est donc pas employé à la synthèse de la protéine d'intérêt. En système acellulaire, l'énergie ajoutée est entièrement consacrée à la synthèse protéique et la durée d'expression des protéines se compte en heures voire en minutes. Les extraits d'*E.coli* qui ont été les plus optimisés pour produire des protéines sont passés d'un rendement de 0,3mg/mL/h au début des années 2000 à plus de 0,7mg/mL/h dans les années 2010 <sup>280</sup> (figure 46). De même, lorsque de faibles quantités de protéines sont requises, par exemple pour la détection d'interaction protéine-protéine ou protéine-ARN par western blot ou par radiomarquage, le RRL permet de produire plusieurs nanogrammes de protéines par millilitre en moins de 30mn.

### 3.3.2... marquées

Il est possible d'utiliser de nombreux marqueurs radioactifs comme le <sup>35</sup>S, incorporé dans la méthionine ou la cystéine, pour identifier et quantifier une protéine d'intérêt ou encore d'utiliser des acides aminés non biologiques pour étudier la fonction d'une protéine. De plus, la fonctionnalité de certaines protéines peut-être rapidement testée comme la production de kinases en WGE suivi d'un ajout de [<sup>32</sup>P]ATP qui permet de contrôler leur capacité à s'autophosphoryler <sup>307</sup>. Enfin, la culture de cellules en milieu enrichi en acides aminés marqués nécessite plusieurs jours d'adaptation et cette méthode peut provoquer des perturbations de l'homéostasie cellulaire, sans oublier que les acides aminés peuvent aussi être métabolisés dans la cellule et biaiser le résultat final. *In vitro*, l'ajout d'acides aminés marqués au <sup>15</sup>N permet d'obtenir rapidement et sans les effets indésirables décrits



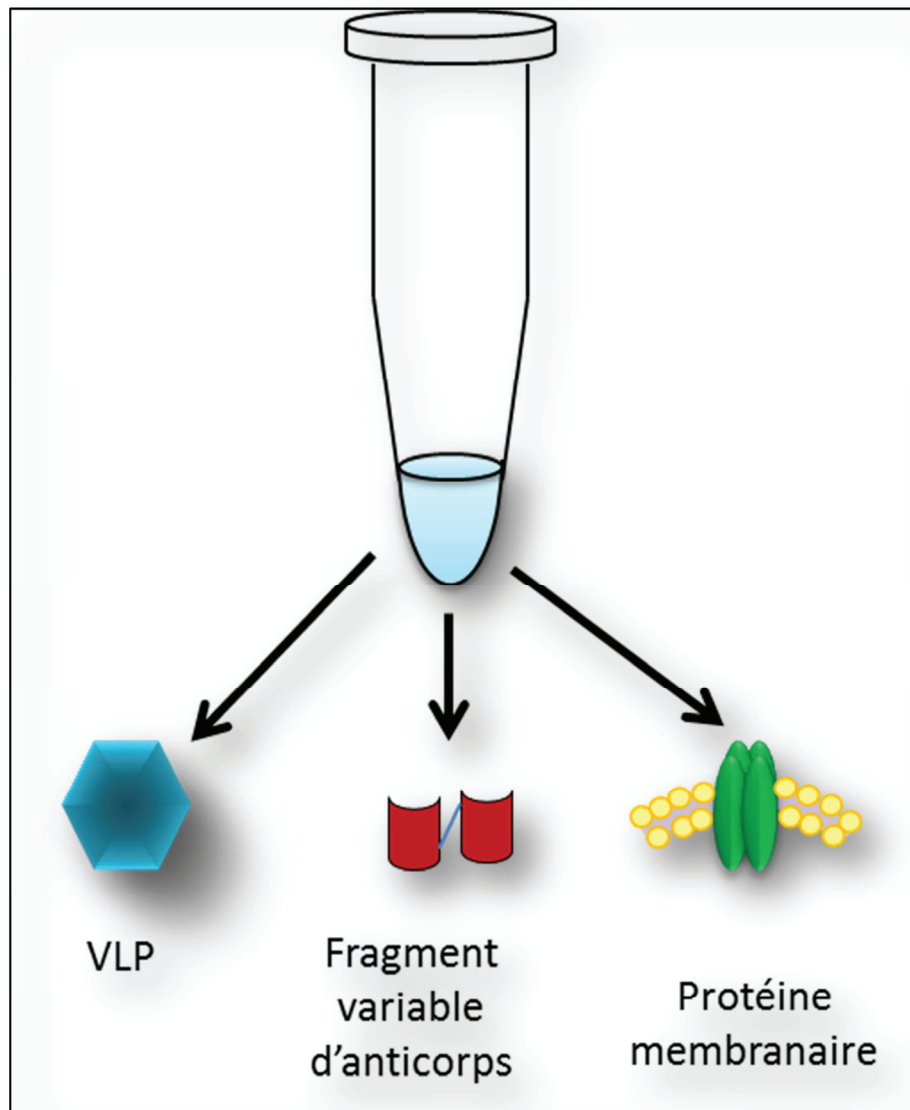


Figure 47: *Applications des extraits cellulaires*

Les extraits cellulaires peuvent permettre la synthèse de manière contrôlée de nombreux outils de biotechnologie comme des virus like particle (VLP), des domaines variables d'anticorps ou encore des protéines membranaires.

précédemment, des protéines marquées en quantité suffisante pour établir leur spectre de résonance magnétique nucléaire (RMN) et montrer ainsi leur repliement correct<sup>308</sup>.

### **3.3.3...toxiques en cellules**

L'expression de protéines membranaires en cellule provoque souvent un retard dans la croissance voire la lyse cellulaire suite à une perturbation de l'intégrité membranaire et le blocage du transport cellulaire et des processus post-traductionnels<sup>309</sup>. Ainsi, en 2006 on ne répertoriait que 80 structures de protéines membranaires pour des milliers de protéines non-membranaires<sup>310</sup>. Les systèmes *in vitro* s'affranchissent des effets toxiques et les protéines membranaires peuvent-être abondamment produites par ajout de membranes dans le système comme par exemple l'expression de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)<sup>311</sup> (figure 47).

### **3.3.4... d'intérêt médical**

*Plasmodium falciparum* est le principal vecteur de la malaria (paludisme) qui sévit dans les régions tropicales et il n'existe aujourd'hui pas de vaccin efficace contre cette maladie. Une des raisons est la difficulté de produire des antigènes. Les protéines recombinantes produites en *E. coli* sont incorrectement repliées du fait de multiples domaines structurés. Récemment, il a été montré que ces protéines peuvent être produites et correctement repliées en WGE et ainsi servir d'antigène pour l'élaboration de vaccins anti-malaria<sup>312</sup>. Cette approche a également été testée pour la synthèse en système acellulaire d'un vaccin trivalent dirigé contre la neurotoxine botulinique<sup>313</sup>. De manière plus spectaculaire, il est également envisagé de pouvoir produire des protéines à partir de n'importe quel extrait cellulaire qui permettent ensuite de stimuler le système immunitaire d'un patient contre ses

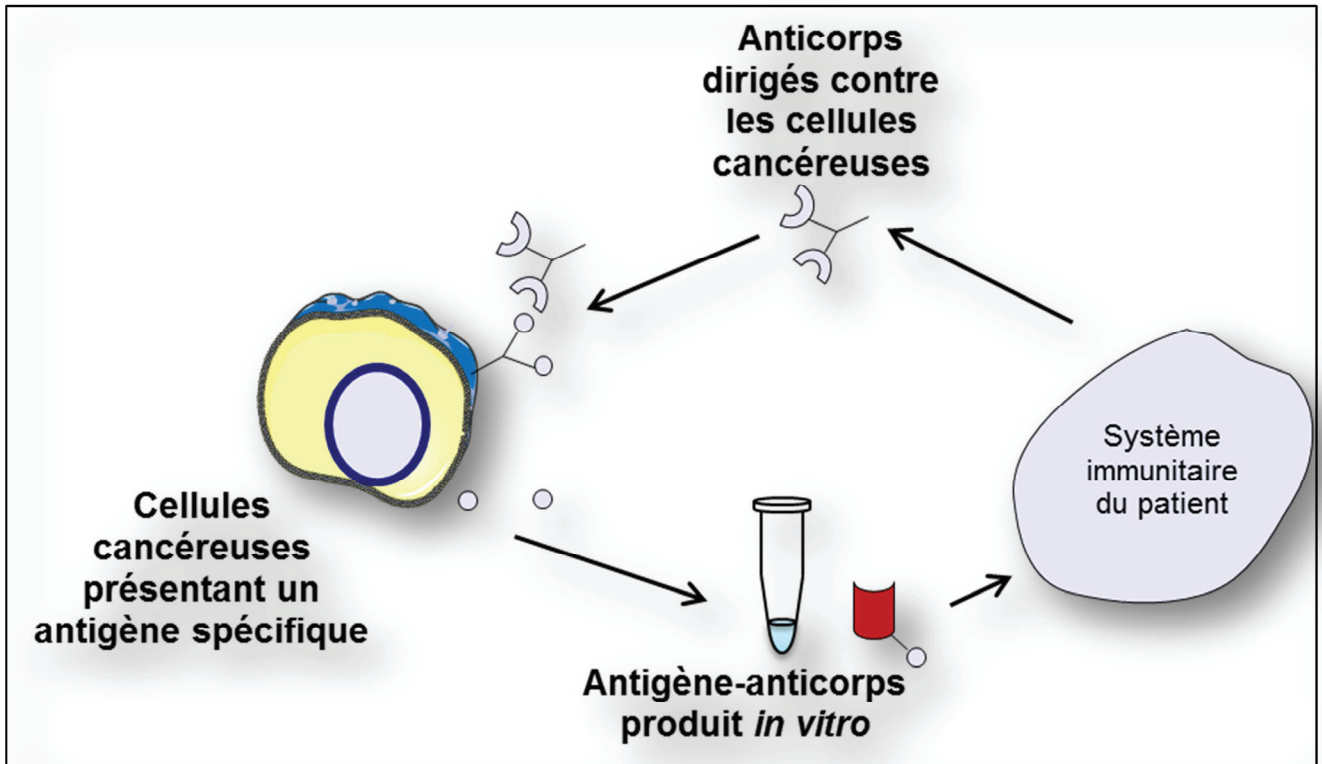


Figure 48: *Systèmes in vitro et vaccin à la carte contre un lymphome (adapté de swartz 2006<sup>314</sup>)*

Une application médicale des systèmes *in vitro* serait de produire en extrait cellulaire des antigènes spécifiquement exprimés par les cellules cancéreuses pour les réinjecter au patient et ainsi stimuler son système immunitaire contre les cellules qui présentent cet antigène.

propres cellules cancéreuses et donc produire des vaccins personnalisés <sup>314,315</sup> (figure 48).

### **3.4 Des systèmes qui peuvent être associés à des technologies de haut débit**

La force des systèmes *in vitro* dans le contexte scientifique actuel est aussi liée à leur capacité d'être couplé à la robotique et donc permettre d'exprimer différentes protéines en parallèle et d'analyser l'expression protéique à haut-débit. Cela serait rendu possible par l'utilisation de techniques de puce de protéines *in situ* (protéines *in situ* array - PISA) basées sur des extraits cellulaires <sup>316</sup>. Les systèmes *in vitro* peuvent également être un outil de production de virus-like particle (VLP) comme par exemple la production de VLP de papillomavirus en WGE <sup>299</sup> ou d'anticorps à la carte <sup>317</sup> qui serviront à leur tour d'outils pour les biotechnologies.

## **4 Limites des systèmes *in vitro* et les réponses associées**

A l'heure actuelle, de nombreux défis restent à relever tout au niveau de la quantité, que la qualité, des protéines synthétisées. Le problème majeur qui se pose dans l'optique d'une production protéique est le coût élevé pour un rendement faible qui sanctionne une mise à l'échelle industrielle <sup>280</sup>. Les acides aminés, les nucléotides et les intermédiaires énergétiques qui sont des compléments indispensables à la traduction et non renouvelés dans les extraits cellulaires (figure 38), ont un coût d'utilisation élevé. Cependant, les avancées récentes dans l'optimisation des systèmes basés sur des extraits d'*E. coli* montrent des rendements de plus en plus importants sans nécessiter plus de matériel <sup>280</sup>.

Pour diminuer le coût associé aux intermédiaires énergétiques, plusieurs études montrent que l'ajout de phosphoénolpyruvate (PEP) ou de créatine

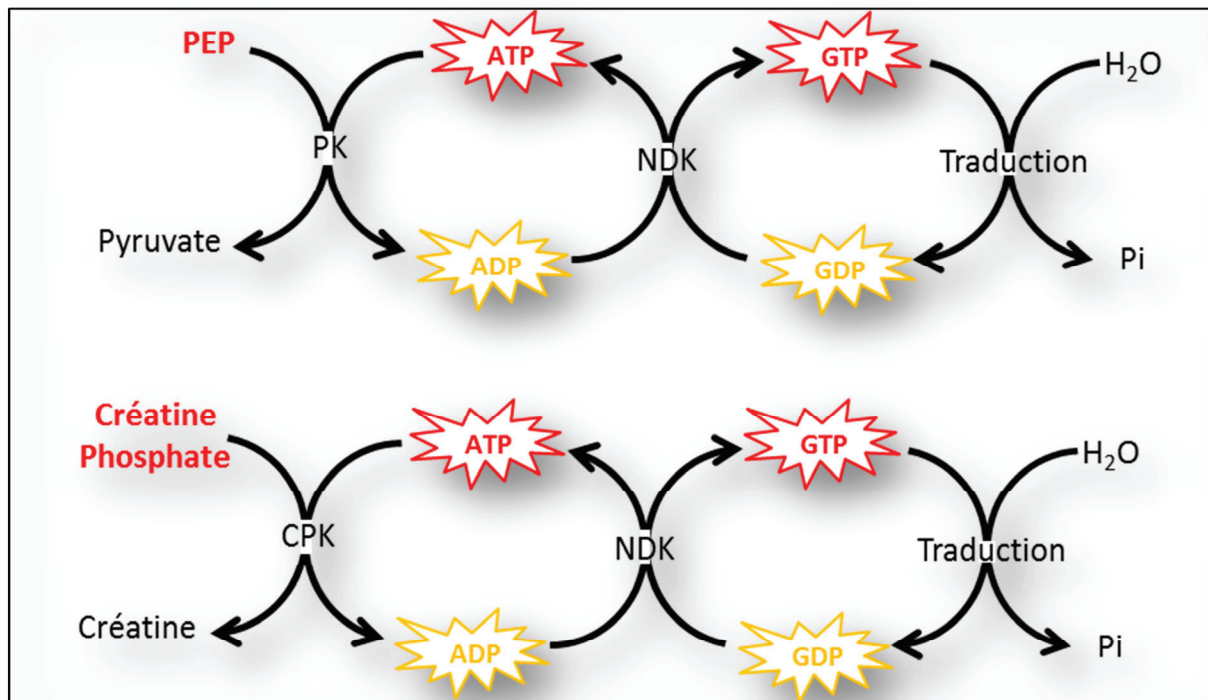


Figure 49: *Principaux substrats énergétiques ajoutés aux systèmes in vitro*

Le GTP, indispensable à la traduction (figure 2) peut être produit à partir de l'ATP par l'intermédiaire des nucléotide-diphosphate kinases (NDK). L'ATP est lui-même renouvelé par la pyruvate kinase (PK) qui consomme du phosphoénolpyruvate (PEP) ou par la créatine phosphate kinase (CPK) qui utilise de la créatine phosphate. Pyruvate, Créatine et ADP sont des déchets qui vont inhiber la traduction en s'accumulant.

phosphate augmentent la durée de synthèse protéique et le glucose-6phosphate (G6P) pourrait être un meilleur candidat car moins onéreux (figure 49). Par ailleurs, la traduction engendre de nombreux déchets qui vont inhiber la réaction de synthèse protéique au cours du temps, comme le phosphate inorganique (Pi) qui séquestre le magnésium <sup>318</sup>. Les systèmes *in vitro* d'expression en continu permettent de contourner ses problèmes par l'apport en continu d'énergie et de substrat associé à un flux d'échange qui élimine les déchets produits <sup>278</sup>.

L'expression de protéines biologiquement actives est également un défi majeur car le repliement co-translationnel reste mal maîtrisé. Plusieurs voies de recherche sont déjà en cours d'étude comme l'optimisation du WGE qui reste le système *in vitro* eucaryote le plus performant avec une production de polypeptides repliés correctement par rapport aux protéines natives <sup>280</sup>. Une autre voie de recherche consiste à compléter les extraits cellulaires par des protéines chaperonnes qui pourraient par exemple servir à produire des parties d'anticorps fonctionnelles ou l'ajout de liposomes qui permettent de produire des protéines membranaires fonctionnelles <sup>280</sup> (figure 50).

Le dernier point à relever est le manque de souplesse des systèmes *in vitro*. Chaque type cellulaire renferme une spécificité dans la synthèse de ses protéines et le passage en RRL ou en WGE pour l'étude de la traduction des Eucaryotes engendre donc une perte d'information cytoplasmique qui ne répondra pas forcément à l'étude de l'expression d'un gène cible.

Parmi les limitations relevées, on peut mentionner le fait qu'il n'a pas été jusqu'à présent proposé d'inactiver ou sur-exprimer en amont des gènes sur des lapins ou plants de blé pour étudier leur impact sur la traduction à partir de lysats. Cette limitation se fait actuellement d'autant plus ressentir que l'ARN interférence ou la surexpression de

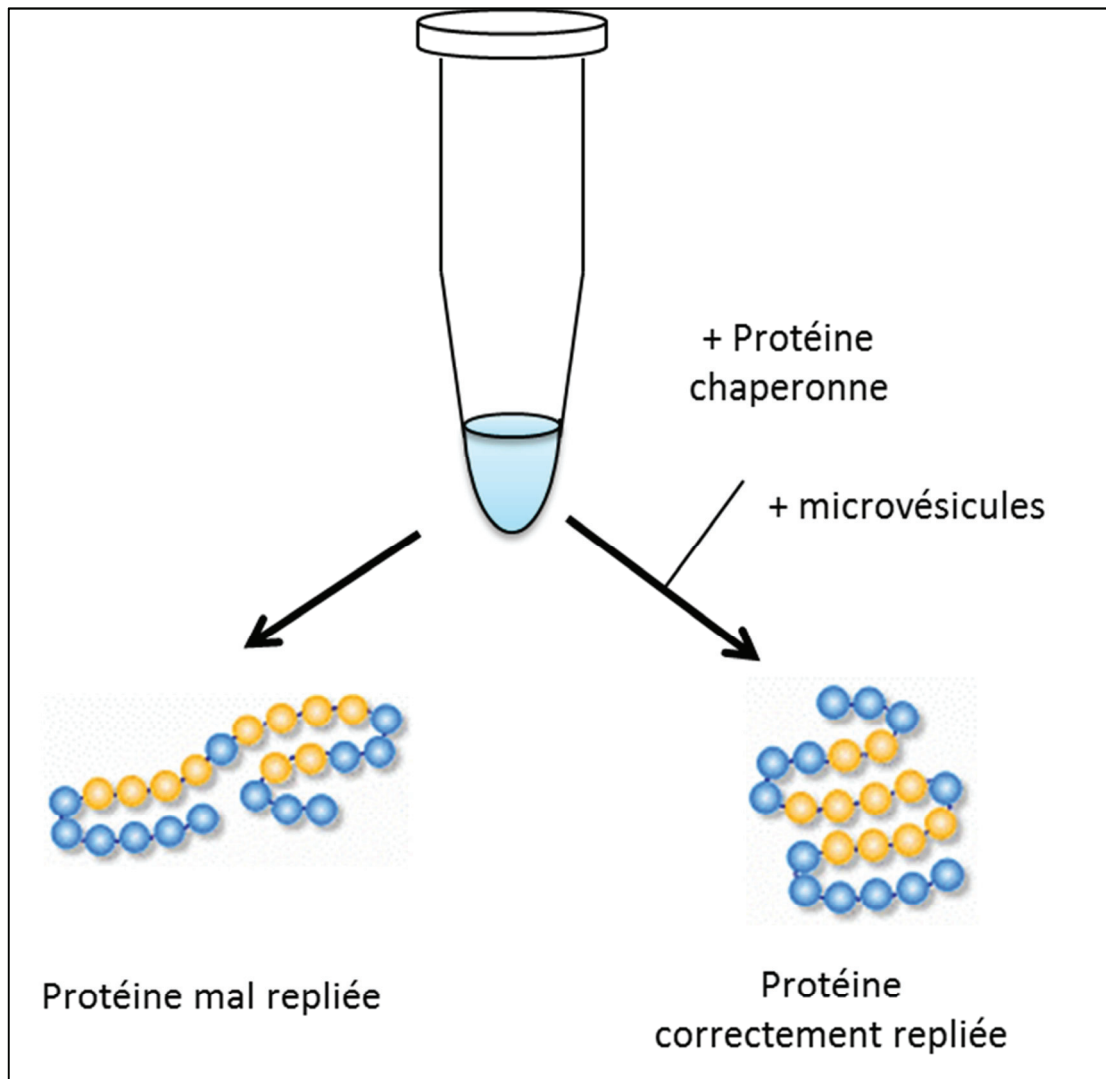


Figure 50: *Système in vitro et repliement correct des protéines néosynthétisées*

Pour produire en lysat cellulaire des protéines correctement repliées, l'extrait peut être supplémenté en protéines chaperonnes ou en microvésicules.

protéines en cellules sont des techniques courantes et aisées à mettre en œuvre en cellules. Ce sont donc de pauvres outils de génétiques alors que l'ARN interférence ou la sur-expression de protéines en cellules sont des techniques courantes et aisées à mettre en œuvre.

Une autre limitation que l'on peut relever dans ces systèmes *in vitro*, c'est qu'ils sont incapables de reproduire les événements liés à l'histoire nucléaire des ARN messagers. Ainsi l'étude de la traduction *in vitro* consiste à transcrire d'abord un ARNm *in vitro* nu qui ne reproduit pas l'ARNm cellulaire qui est associé à des protéines régulatrices lors du passage nucléaire, il y a donc perte d'information nucléaire.



---

# **PARTIE II :**

# **RESULTATS**

---

# Introduction au travail expérimental

Le travail présenté dans cette thèse s'articule autour de l'étude du mécanisme de l'initiation de la traduction et comprend deux axes interdépendants : (i) le design et l'optimisation de systèmes d'expression *in vitro* et (ii) l'étude du contournement du mécanisme de traduction par le virus de l'Influenza A.

J'ai commencé mon étude en Master 2 à partir des 5'UTR des ARNm du virus de l'Influenza A afin de comparer leur efficacité traductionnelle entre elles et par rapport à des 5'UTR issues de gènes cellulaires. Les 5'UTR des ARNm viraux possèdent une double particularité, l'une étant qu'elles sont très conservées parmi les milliers de souches d'Influenza A isolées, et l'autre étant qu'elles possèdent une courte séquence nucléotidique d'origine cellulaire et prise aléatoirement qui est ajoutée lors de la transcription par le phénomène du « capsntatching ». Le début de mon projet a consisté à cloner l'ensemble de ces 5'UTR virales afin de mesurer leur effet dans l'initiation de la traduction. Des mutations ponctuelles m'ont permis de définir les régions les plus importantes mais très vite, je me suis heurté à des difficultés techniques issues des événements nucléaires induits par le virus et qui biaisent les résultats que l'on observe au niveau de la traduction. Je me suis donc concentré alors sur la fraction cytoplasmique des cellules infectées et j'ai mis au point un système *in vitro* d'étude de la traduction, le système hybride, qui conserve l'environnement traductionnel de la cellule infectée tout en s'affranchissant des événements nucléaires.

Une grande partie de mon travail a consisté à élaborer puis valider ce système hybride qui a fait l'objet d'une demande de brevet par l'INSERM transfert et qui est maintenant soumis à publication.

Ensuite, j'ai pu m'intéresser de nouveau au virus de l'Influenza A et notamment travailler sur la protéine virale NS1. Cette protéine multifonctionnelle agit à tous les niveaux d'expression d'un gène et j'ai donc choisi de réaliser une étude essentiellement *in vitro* en lysat de réticulocyte de lapin. Cela a permis de démontrer que NS1 affecte l'initiation de la traduction et joue le rôle d'un stimulateur global de la synthèse protéique. Ce travail fait l'objet d'un second article qui devrait être soumis très prochainement.

## 1. Article 1

### Développement d'un système *in vitro* hybride de traduction (manuscrit soumis)

Cet article présente un nouveau système *in vitro* qui permet à la fois de produire des protéines et d'étudier le mécanisme d'initiation de la traduction.

Nous présentons dans un premier temps le protocole qui consiste d'une part à éliminer les ribosomes du lysat de réticulocyte de lapin (RRL), le seul système *in vitro* issu des Mammifères qui présente une activité traductionnelle efficace, en le suppléant d'autre part avec des culots de protéines cytoplasmiques issus de différents types cellulaires. Cette approche permet de reconstituer un système traductionnel hybride dont l'efficacité est comparable à celle du RRL natif.

Nous nous sommes ensuite attachés à valider la spécificité du système hybride en comparant des effets traductionnels observés en cellules à ce que l'on obtient avec ce nouveau système *in vitro*. L'article ci-après développe ainsi des phénomènes traductionnels liés à des profils cellulaires spécifiques suite à une différenciation cellulaire ou un stress qui affecte le métabolisme cellulaire.

Enfin, de par son design, ce système permet de travailler avec des ARNs qui sont synthétisés dans les cellules d'origine et qui sont purifiés lors de l'isolement du culot ribosomique. Ainsi, ces ARNs sont associés à leur complexe ribonucléoprotéiques natifs (RNP).

***in vitro veritas*: an adaptable mammalian cell free system  
that recapitulates physiological cellular conditions for  
protein synthesis**

Baptiste Panthu<sup>1,2,3,4,5</sup>, Didier Decimo<sup>1,2,3,4,5</sup>, Laurent Balvay<sup>1,2,3,4,5</sup>, Sandrine Gonin-Giraud<sup>6</sup>, Olivier Gandrillon<sup>6</sup> and Théophile Ohlmann<sup>1,2,3,4,5\*</sup>

1 CIRI, International Center for Infectiology Research, Université de Lyon, Lyon, France.

2 Inserm, U1111, Lyon, France.

3 Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France.

4 Université Lyon 1, Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon, France.

5 CNRS, UMR5308, Lyon, France.

6 Université de Lyon, Université Lyon 1, Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaire et Cellulaire (CGPhiMC), CNRS UMR5534, F-69622 Lyon, France

\* To whom correspondence should be addressed.

TO: Tel: (33) 472 72 89 53; Fax: (33) 472 72 81 37; Email: [tohlmann@ens-lyon.fr](mailto:tohlmann@ens-lyon.fr)

## Abstract

Eukaryotic *in vitro* translation systems have been widely used over the last 30 years as they allow efficient protein expression with an easy to use system. However, neither of the existing *in vitro* translation system can combine a high expression yield with the recapitulation of the cellular physiological environment. In fact, systems based on mammalian cell extracts provide a competitive environment mimicking well conditions found in living cells but usually exhibit a rather poor level of expression whereas reticulocyte lysate based systems can produce proteins very efficiently but lack most features of mammalian translational control.

We have designed and engineered a hybrid *in vitro* assembled from the reticulocyte lysate post-ribosomal supernatant with ribosomes isolated from cultured cells. Interestingly, we show that the addition of ribosomes from a given cell type is sufficient to confer most, if not all, of the translational characteristics found in living cells. As such, we could recapitulate cap/poly(A) synergy, the selective advantage of IRES-driven translation and, above all, cellular tropism that is observed in some cell types and with some specialized mRNAs.

By design, the hybrid system allows to use of RNA interference to deplete any endogenous ribosome associated protein and this expression system can be programmed either with *in vitro* transcribed RNAs or RNAs expressed from plasmid cDNAs that have been transcribed and processed *in cellulo*. Finally, we show that modifications that affect the structure and composition of ribosomes *in vivo* can be studied in our hybrid system. This was demonstrated by using primary avian cells that were transformed with V-erbA which generates 60 S subunit devoid of RPL11.

## Introduction

Cell free protein synthesis systems (CFPS) have been used for decades to express proteins from ectopically added nucleic acids that could be either mRNAs or cDNAs (For a recent review, see (Carlson et al, 2012)). CFPS are excellent tools to rapidly and efficiently produce proteins with a pharmaceutical interest such as vaccine components and cytokines (Kanter et al, 2007; Yang et al, 2004; Yang et al, 2005; Zawada et al, 2011), are routinely exploited to perform ribosome display (Pluckthun, 2012) and high throughput production of protein libraries (Goshima et al, 2008). *In vitro* translational assays represent a good alternative for directly sampling and screening molecules due to the absence of cell wall. Above all, CFPS have been used in many ground breaking experiments such as the discovery of the genetic code (Nirenberg & Matthaei, 1961) and have been instrumental in deciphering many biological pathways involved in mRNA stability, processing, miRNA regulation and translation (Mathonnet et al, 2007).

CFPS are made from crude cell extracts and contain all necessary components for energy generation and the complete apparatus for protein synthesis (e.g. ribosomes, tRNA and aminoacyl-tRNA synthetases, initiation, elongation and termination factors, chaperones, amino acids etc...). Interestingly, the concentration of these endogenous components can be manipulated by chemicals, enzymes, or modified by the addition of recombinant proteins (Ohlmann et al, 1997; Ohlmann et al, 2002; Ziegler et al, 1995a; Ziegler et al, 1995b). In addition, the short incubation time and the good level of standardization of commercially available CFPS render experimental procedures very easy to use and reproduce. All these features make *in vitro* systems very powerful tools for research.

In theory, it should be easy to prepare translation competent cell free extracts from any cell types. However this is not the case and only a few cell-free active systems have been

developed in the last 3 decades with lysates made from *E. Coli*, wheat germ, insect cells and rabbit reticulocyte being the most commonly used (Carlson et al, 2012). Whilst the *E.coli*, wheat germ and insect cells are excellent tools to produce large amounts of a given protein, they are not adequate for studies on the pathway of mammalian translational control.

Thus, these investigations have been rather conducted in the rabbit reticulocyte lysate which was developed by Hunt and Jackson whose first prototype was made in 1974 (Hunt & Jackson, 1974) and later optimized for protein production by disposing of the endogenous mRNAs with the calcium activated S7 micrococcal nuclease (Pelham & Jackson, 1976). Since then, both the untreated (URRL) or nuclease treated rabbit reticulocyte lysate (RRL) have been successfully commercialized and widely used by the scientific community to produce [<sup>35</sup>S]-methionine labeled proteins for biochemical purposes such as protein-protein, protein-RNA, protein-DNA interactions. This is the reason why the reticulocyte lysate has been instrumental to decipher many of the biochemical pathways involved in the regulation of translation (Jackson et al, 2010). However, a major concern with the reticulocyte lysate is that it does not recapitulate some important translation characteristics that are found in a cellular environment. One of them concerns the lack of cap- and poly(A) dependence which is a critical determinant in translational control (Beilharz et al, 2010; Lemay et al, 2010; Tomek & Wollenhaupt, 2012). Recent advances in the field of RNA silencing has further stressed the importance of the poly(A) tail as a key player to control both translational efficiency and RNA stability (Beilharz et al, 2010). Therefore it is a major drawback that the S7 treated RRL fails to recreate the selective advantage conferred by addition of the cap and the poly(A) tail to the mRNA (Munroe & Jacobson, 1990; Preiss & Hentze, 1998). It is noteworthy that partial depletion of ribosomes and ribosome-associated factors can recreate such a selective advantage in the reticulocyte lysate but, at the same time, has an impact on the yield of proteins produced (Borman et al, 2000; Michel et al, 2000). Likewise, we have shown that the



untreated RRL could recreate cap/poly(A) synergy but the presence of endogenous globin and lipoyxygenase mRNAs may interfere with RNA and protein expression (Soto Rifo et al, 2007). Finally, the physiological relevance of the RRL has often been criticized for the study of human genes or viral RNAs that infect humans as it may not contain all factors required for their expression. Along this line, it is noteworthy that many IRES-driven mRNAs of cellular and viral origins are not, or poorly, translated in the rabbit reticulocyte lysate (Borman et al, 1995; Borman et al, 1997; Stoneley et al, 2000b; Stoneley & Willis, 2004).

As an alternative, several *in vitro* translation systems based on extracts from mammalian cells have been developed over the last years (Bergamini et al, 2000; Svitkin & Sonenberg, 2004; Thoma et al, 2004; Witherell, 2001); recently Pierce has made a HeLa based translation system commercially available. Whilst all these systems are faithful to recreate a competitive cellular environment, they are usually tedious to make and quite inefficient in terms of the yield of protein produced. Although they are suitable to use with sensitive reporter genes such as luciferases whose activity can be determined enzymatically it is often very difficult to visualize the synthesis of a given gene by the readout of [<sup>35</sup>S]-methionine incorporation. This is a major draw back as it is often necessary to observe the translation product of a given gene in order to ensure that it is not degraded or truncated or to visualize any isoforms that can be produced by alternative translation initiation or internal initiation as it was shown for HIV-1, HIV-2 (Balvay et al, 2007; Balvay et al, 2009; de Breyne et al, 2012; Herbreteau et al, 2005).

Therefore, our initial goal was to develop a mammalian *in vitro* system that could combine efficient protein production with features of translational control that are only found in a cellular competitive environment. For this, we have designed a highly adaptable *in vitro* system which relies on mixing components obtained from the rabbit reticulocyte lysate with ribosomes that have been purified from many different cultured cells including HeLa, Jurkat, BHK, mouse stem cells and undifferentiated myoblasts. Such a reconstituted *in vitro* lysate

retains the high efficiency of the parental RRL and recapitulates translational characteristics observed in cells from which the ribosomes have been isolated. For instance we could reproduce translation stimulation of mRNAs that are activated by cell differentiation. We further show that our system can also be used for the preparation of an *in vitro* translational assay in which one (or several) endogenous proteins has been depleted by RNA interference. Moreover, this system also allows to translate mRNAs that had been transfected as cDNA plasmids in cultured cells and isolated together with the ribosomal pellet. The advantage of this method is that it skips the *in vitro* transcription step and allows to study translation of transcripts that have been synthesized and processed in their native environment. Finally, we showed that ribosomes devoid of RPL11 as a consequence of v-erbA transformation of T2EC cells retained their translational characteristics in our *in vitro* hybrid system.

## Results

### *A comparison of translational efficiency in some CFPS*

Given the diversity of *in vitro* translation systems, we first wanted to compare the most commonly used ones such as the rabbit reticulocyte (treated or not with the S7 nuclease), the wheat germ and the newly available Human lysates from Pierce which is prepared from HeLa cell extracts. For each of these lysates, we have monitored their ability to translate *in vitro* transcribed mRNAs. We have used the renilla luciferase whose expression was driven either by the  $\beta$ -globin (50 nts) or the GAPDH (102 nts) 5' untranslated region (5'UTR). These RNA constructs harbor a m<sup>7</sup>GTP cap moiety together with a 50 adenylate residue poly(A) and were translated in either the crude rabbit reticulocyte lysate (URRL), the micrococcal treated rabbit reticulocyte lysate (RRL), the wheat germ lysate (WG) and the human *in vitro* protein expression system (HL pierce). Results obtained are summarized in Fig 1A for the mRNA that is driven by the  $\beta$ -globin 5'UTR and 1B for the one driven by the GAPDH leader. For both mRNAs, the best translational efficiency was obtained in the rabbit reticulocyte derived systems, namely URRL and RRL. This was observed at all RNA concentrations tested (0,27 ; 2,7 and 27 nM) and even with saturating amounts of exogenous mRNAs added (Fig. 1C). It is noteworthy that addition of high concentration of mRNAs (from 27 nM to 270 nM) was mostly beneficial to the HL systems in terms of global translational efficiency (see Fig. 1C) but it remained below the level of activity observed in the RRL.

### *Design of a novel hybrid in vitro translation system*

Our aim was to design a novel *in vitro* cell free system that can combine translational efficiency and characteristic features of living cells. To do that, we reasoned that we could

create a hybrid translational system between components of the rabbit reticulocyte lysate with those derived from cultured cells.

In order to do this, we have first adapted the method developed by Rau et al, in 1998 which consists of fractionating the rabbit reticulocyte lysate into a S100 supernatant and the ribosomal pellet (Rau et al, 1998) by centrifuging at 240 000 g for 135 mn. This results in the separation of the cytosolic components of the protein synthesis apparatus from ribosomes associated one: both fractions can be rapidly frozen and stored at -80 °C for several months (see Fig. 2A and materials and methods).

In a first attempt, we have mixed components from the URRL with those of the RRL in the 4 possible combinations (Su+Rurrl; Sr+Rrrl, Sr+Rurrl and Su+Rrrl) that were all used to translate the Renilla construct driven by the  $\beta$ -globin 5'UTR (Fig. 2B). It can first be observed that the supernatant fraction (without ribosomes) did not yield any luciferase activity (see Su and Sr) confirming that the bulk of ribosomes were removed during the centrifugation step.

The renilla construct was translated in both parental lysates (URRL and RRL) and efficiency was compared with the homologous reconstituted systems (Su+Rurrl and Sr+Rrrl). Although translational activity was of similar magnitude for both URRL and RRL, it was not the case once the systems were reconstituted with the Su+Rurrl being about twice as efficient as the reconstituted Sr+Rrrl. Interestingly, we also observed that the Su+Rrrl was the best combination for heterologous systems with a translational yield comparable to that obtained with the parental lysates (Fig. 2B). These data suggest that the S100 supernatant from the untreated lysate (Su) is the most efficient fraction and will be selected to serve for the basis of the hybrid lysate (see later).

In order to optimize the system, we have then determined the optimal amount of ribosomes (from RRL) that can be mixed to the untreated lysate supernatant (Su) and we found that 1 $\mu$ g

of pelleted ribosomes yielded the best translational efficiency (Fig. 2C) which corresponds to only 0.05 X (1/20) of the parental ribosome concentration.

These data were used to elaborate a hybrid reconstituted cell free system in which the ribosomes are isolated from cultured cells whereas the S100 supernatant is provided by the URRL (see cartoon, Fig.2D). We used 2 human cell lines (HeLa and Jurkat), the RRL and URRL and the wheat germ lysate to yield 5 ribosomal pellets (Rurrl for ribosomes of the URRL; Rrrl for ribosomes of the RRL; Rh for ribosomes obtained from the HeLa lysate S10; Rj for ribosomes obtained from Jurkat cells and Rwg for ribosomes from the WG lysate). The post-ribosomal supernatant of the URRL was used to generate the cytosolic fraction (Su for supernatant of the URRL). Hybrid reconstituted systems were assembled by mixing the ribosome fractions (R) with the S100 supernatant from the URRL (Su) in all possible combinations. In these systems, 2.7 nM of the globin-renilla reporter gene was translated for 30 mn before analysis of renilla activity. Data showed that all combinations with mammalian ribosomes resulted in efficient protein synthesis to a level comparable to that observed with the reconstituted RRL or the parental lysate (Fig. 2E, compare Rrrl and URRL with Rurrl/Rh/Rj). However, virtually no renilla activity could be detected with wheat germ ribosomes (Fig. 2E, see Rwg). These experiments were extended to ribosomes isolated from 'non specialized' cells such as mouse stem cells that were obtained following the same experimental procedure (Fig.2F). Upon reconstitution of hybrid system containing stem cell ribosomes, translation of the globin-renilla construct was just as efficient as in the RRL system (Fig. 2F, compare RRL and Rsc).

Because only minute amounts of renilla are needed for efficient detection and quantification, it could be argued that protein production in the hybrid system is not that efficient after all. Moreover, as discussed in the introduction, it could be of interest to use a CFPS in which protein production occurs in a sufficient yield to be able to detect the neo synthesized protein

by [<sup>35</sup>S]-methionine incorporation. Thus, we have programmed the hybrid system (Su+Rh) with reporter mRNAs that are routinely used in laboratories (GFP, renilla and firefly luciferase genes driven by the  $\beta$ -globin 5'UTR) in the presence of radioactive [<sup>35</sup>S]-methionine. At the end of a 30 mn incubation, proteins were resolved on SDS-PAGE and the dried gel submitted to autoradiography (Fig. 2G). This shows that the protein products from all reporter genes were detected as a single sharp band indicating that protein synthesis had occurred efficiently and faithfully with neither truncated aborted polypeptides nor shorter diffuse isoforms that could be indicative of premature protein degradation or ribosome drop-off.

Finally, we have compared side by side the efficiency of the manufactured expression system based on HeLa lysates (Pierce) with our hybrid lysate containing HeLa ribosomes. For this, the globin renilla reporter gene was translated at a broad spectrum of RNA concentration and renilla activity was measured after 30 minutes. The results are presented in Fig. 2H and show that for all RNA concentrations tested, our system was several fold more efficient than the pierce lysate. The bottom panel summarizes these data that are plotted on a logarithmic scale.

Taken together, these data validate the use of ribosomes isolated from mammalian cell lines in the context of the rabbit reticulocyte lysate.

### ***The hybrid system recapitulates cap/poly(A) synergy and support IRES-driven translation***

One of the major draw back of the nuclease treated rabbit reticulocyte lysate is that it fails to recreate the selective advantage conferred by the addition of the poly(A) tail on transcripts and does not recapitulate the cap/poly(A) synergistic effect on translation (Borman et al, 2000). Such a property can be found in the crude RRL but use of the latter is restricted by the

synthesis of endogenous globin and lipoxygenase which can interfere with ectopic gene translation both at the level of RNA and protein production (Soto Rifo et al, 2007).

Therefore, we next set to investigate how the hybrid system could recapitulate the effects of capping and polyadenylation. For this, we used *in vitro* transcribed globin renilla genes which were produced in the four possible combinations, capped/polyadenylated (+/+), capped/non polyadenylated (+/-), uncapped/polyadenylated (-/+) and uncapped/non polyadenylated (-/-) as indicated (see cartoon on Fig. 3A). The resulting RNAs were added to the hybrid SuRh (Supernatant of URRL with ribosomes from HeLa) or the nuclease treated lysate (RRL) as control. As it could be seen on Fig. 3B, the level of translation in both systems was pretty similar when the mRNA harbored a cap at its 5' end. However, omission of this cap resulted in the virtual absence of activity in the hybrid system (see -/+) and this was even further evidenced when the poly(A) tail was missing (see -/-) whereas both combination were still translated in the RRL, albeit to a lower efficiency. This indicates that the hybrid system reconstitutes a more physiological cap/poly(A) driven translational environment.

Many studies have focused on internal initiation which is the mechanism used by some mRNAs to recruit ribosomes at an internal position with no need for a 5' cap structure (Balvay et al, 2009). Some *in vitro* systems are very inefficient to support internal initiation and this was notably shown for the WG lysate in which picornaviral RNAs are poorly expressed (Woolaway et al, 2001).

To assess translation of IRES-containing RNAs, we have used a bicistronic construct coding for the firefly (first gene) and the renilla (second gene) in which the Encephalomyocarditis virus IRES (EMCV) was inserted in the intercistronic spacer. As seen on Fig. 3C, production of the first gene firefly was efficient in all three CFPS tested (WG, RRL and Rh) whereas

renilla synthesis which results from IRES expression, was only observed in the RRL and Rh lysates (right panel) but not the WG as previously shown (Woolaway et al, 2001).

We next checked whether the hybrid system could recapitulate some selective selections that are encountered in the course of picornaviral replication. One of those is created by the cleavage of the initiation factor eIF4G by the virally encoded L protease from the picornavirus FMDV (Ohlmann et al, 1995; Ziegler et al, 1995b). In infected cells, such a proteolytic event results in the collapse of cellular cap-dependent protein synthesis whereas translation from the viral IRES is stimulated (Devaney et al, 1988; Hambidge & Sarnow, 1992; Krausslich et al, 1987; Ziegler et al, 1995b). Interestingly, the addition of the L protease in the RRL results in a quite attenuated effect of the viral enzyme in comparison to what happens in living cells; as such, in the RRL, cap-dependent translation is decreased and a mild stimulation of the picornaviral IRES is generally observed (Ohlmann et al, 1995; Soto Rifo et al, 2007). Therefore, we have added the *in vitro* translated L protease to both the RRL and the hybrid system prior to translation of the firefly-EMCV-renilla bicistronic construct used above. Western blot analysis showed that eIF4G was similarly proteolysed in both assays (data not shown) and protein production was determined by [<sup>35</sup>S]-methionine incorporation in order to better compare the variations of expression of the two genes (Fig. 3D). This shows that the addition of L protease stimulates renilla production whereas firefly synthesis was diminished in the RRL and virtually abolished in the hybrid system (Fig. 3D, lanes 2 and lanes 4).

Finally, we wanted to evaluate the ability of the hybrid system to reproduce very peculiar translational conditions that can be encountered with some dicistrovirus IRESes such as the intergenic IRES from the Cricket Paralysis Virus (CrPV). Initiation on this RNA takes place by direct binding of the 40 S ribosomal subunit in the absence of any initiation factors (Wilson et al, 2000). This confers to the virus a selective advantage over cellular translation



during infection, as it was shown that drastic physiological conditions such as eIF2 phosphorylation, stress or initiation factors depletion enhances CrPV translation (Garrey et al, 2010).

Therefore, we have isolated the HeLa ribosomes at different KCl concentrations ranging from 25 mM to 500 mM. At the highest salt concentration, most of the ribosomes associated factors including eIFs are washed out and not present anymore in the ribosomal pellet (data not shown). Hybrid systems were assembled with these ribosomes purified under increasing chaotropic conditions and were used to measure translation driven by the CrPV IRES (Fig. 3E). This clearly shows that expression of the latter was stimulated by the loss of ribosome associated factors (Fig 3E, see 300 and 500mM KCl concentrations). This sharply contrasts with the  $\beta$ -globin-renilla mRNA which was severely inhibited under the same conditions (Fig. 3F). These data confirm that translation of the CrPV can benefit from conditions where initiation factors are inactivated or present in severely limiting concentrations as previously described (Garrey et al, 2010; Pestova & Hellen, 2003); this further shows that the hybrid system can be used for translation of very specialized mRNAs under specific physiological conditions.

### ***The hybrid system recapitulates cellular tropism***

Our data indicate that the addition of ribosomes isolated from HeLa cells confer cap/poly(A) synergy to the lysate, reconstitute the ability to internal initiation and conserve the good translational efficiency of the reticulocyte lysate. Therefore, we next wanted to investigate whether the hybrid system could reconstitute cellular tropism. It has been shown that some IRES-containing mRNAs, notably those driven by the poliovirus IRES, were poorly expressed in the reticulocyte lysate and this can be partially rescued by the exogenous addition of HeLa

S10 cell extracts to the reticulocyte lysate (Borman et al, 1995). Thus, we have compared expression of the PV IRES in the reticulocyte lysate and in the hybrid system which was assembled with ribosomes from HeLa cells (Su+Rh). As a control, the  $\beta$ -globin-renilla construct was also translated in the two assays (RRL and hybrid system). Results are presented in Fig. 4A and are expressed as a % of translational efficiency measured for the globin control (glo) which was set to 100 %. For the 3 concentrations of RNA tested (2,7 ; 13,5 and 27 nM), globin expression was far above that of the PV driven constructs as expected (Borman et al, 1995). Interestingly, although the translation rate of the PV construct remained low and constant at all RNA concentrations in the RRL, this was clearly not the case when the same construct was assayed in the hybrid system. In fact, at the highest RNA concentration, PV-IRES-driven translation was nearly half that of the globin renilla construct in the hybrid system (Fig. 4A) (compare with the approximately 10% reached by the PV RRL combination at highest RNA concentration). This shows that HeLa ribosomes can support PV IRES driven translation.

The next step was to conduct the reverse experiment which consists of adding ribosomes isolated from cells that do not support PV IRES translation such as Baby Hamster Kidney cells (BHK) (Borman et al, 1997). Indeed, these cells are thought to lack one, or several, factors that are needed for PV IRES translation (Borman et al, 1995; Borman et al, 1997). Thus, we have taken advantage of this property to test the limits of our system.

In an initial control experiment, we have transfected by electroporation a mRNA harboring the PV IRES (or the globin 5'UTR) into BHK cells (Fig. 4B). Analysis of the renilla activity confirmed the data of Borman and colleagues showing that PV-IRES translation was very inefficient in this cell type (Borman et al, 1997).

Thus, a hybrid reconstituted translation system was prepared with ribosomes isolated from BHK cells that were mixed to the S100 URRL supernatant. Translation of the reporter mRNAs in the *in vitro* hybrid system showed that expression from the PV containing construct remained extremely low indicating that BHK ribosomes are unable to support PV-driven translation (Fig. 4C). This contrasts with the globin-renilla construct which was correctly expressed in the hybrid system indicating that the BHK ribosomes are not deficient to support global protein synthesis.

Together, these data indicate that the addition of ribosomes from a given cell type is sufficient to recreate cellular tropism for translation of IRES-driven genes.

### ***The hybrid system restitutes the effects of cell differentiation on translation***

The next step was to investigate whether our system could recapitulate changes in physiological conditions that can be found in cells upon different stimuli. We reasoned that cell differentiation would represent an excellent model of study as during this process, the cell goes through major physiological changes that also affect protein synthesis (Ma & Blenis, 2009; Thoreen et al, 2012). As a first approach, we have looked at the expression of 3 renilla reporter genes whose translation was driven by the globin, GAPDH and the utrophin 5'UTR (which was shown to be particularly enhanced at the level of translation during myoblast differentiation (Miura et al, 2005)). As a model for cell differentiation, we have used C2C12 mouse myoblastic cells to which horse serum was added to induce differentiation into myotubes as previously described (Kubo, 1991). Fig. 5A shows the translation of capped and polyadenylated *in vitro* transcribed mRNAs that were electroporated in C2C12 mouse myoblastic cells. Luciferase activity was measured before (undifferentiated) and 15h after (differentiated) horse serum addition as indicated (Fig 5A). It can be noticed that translation

from all three mRNAs was strongly stimulated in C2C12 cells that are engaged in the differentiation process. As expression from the utrophin driven construct was quite low, a blow up picture is presented below.

In order to investigate whether the effects observed in C2C12 could be recapitulated *in vitro*, we have isolated ribosome pellets from undifferentiated and differentiated C2C12 cells that were assembled with post-ribosomal supernatant from the URRL. *In vitro* transcribed globin, GAPDH and utrophin mRNAs described above were translated for 30 minutes before analysis of renilla activity (Fig. 5B). Interestingly, translational activity from all 3 constructs was also stimulated by the addition of ribosomes derived from differentiated C2C12 cells. Once again, this nicely shows that the reconstituted hybrid system could reproduce specific physiological conditions of living cells.

### ***Design of a factor-depleted hybrid system by the use of RNA silencing***

In contrast with living cells, CFPS offer the possibility to manipulate the level of endogenous components by relatively simple and highly standardized biochemical protocols. As such, removal can be carried out by affinity column chromatography or immunodepletion whereas inactivation can be achieved by enzymatic cleavage, chemicals or antagonist peptides. However, there remain several limitations such as the requirement for specific antibodies or antagonists and unwanted side effects that can result from the addition of these molecules to the translation assay. Therefore, we propose to use another approach. As most proteins involved in translational control are found associated with the ribosomal fraction, we reasoned that we could perform efficient depletion of a given factor by the use of RNA interference in cultured cells prior to ribosome purification. To demonstrate the proof of concept of this experimental protocol, we have taken advantage of our recent data showing that the DEAD-

box RNA helicase DDX3 is required for translation of the HIV-1 genomic RNA (Soto-Rifo et al, 2012). For this, HeLa cells in culture were depleted from endogenous DDX3 by the use of shRNAs as described in Materials and Methods; the extent of DDX3 knockdown was checked by western blot and showed that most of the endogenous DDX3 was removed from the ribosomes (Fig. 6A). It is noteworthy that DDX3 was exclusively found on the ribosomal fraction with no detectable protein left in the post-ribosomal supernatant (Fig. 6A compare S100 with C100). Transfection of RNA constructs harboring the globin or the HIV-1 5'UTR was then realized in HeLa cells that were treated, or not, with shRNAs against DDX3 (Fig. 6B). As previously shown (Soto-Rifo et al, 2012), translation from the globin-renilla RNA construct was not affected by the lack of DDX3 whereas the construct driven by the HIV-1 5' UTR exhibited a significant drop in translational efficiency upon DDX3 knockdown (Fig. 6B).

From these DDX3 knocked-down and control HeLa cells, we have isolated the ribosome fractions and added it to the S100 supernatant of an untreated RRL (Su) as described above. *In vitro* produced RNA constructs, namely globin and HIV-1 renilla, were translated in the hybrid reconstituted system and the results are presented in Fig. 6C. Interestingly, we can observe that translation of the globin-renilla RNA was marginally affected whereas translation from the HIV-1 5' UTR containing mRNA was severely reduced (Fig. 6C) in the hybrid system that was assembled with ribosomes that lack DDX3. Once again, these results are matching data obtained in living cells (Fig. 6B) showing that the *in vitro* system faithfully recapitulates the physiological conditions of the cell. It is noteworthy that the level of inhibition upon DDX3 depletion was higher in the *in vitro* system than in cells.

### *Use of the hybrid system with RNAs transcribed and processed in cellulo*

As the hybrid system relies on the isolation of crude ribosomes from cells, we reasoned that we could take advantage of this situation to isolate ribosome associated RNAs from an ectopically expressed cDNA plasmid. As such, the ectopic gene would be synthesized, processed and exported by the cellular machinery; it would undergo transcription, splicing, capping/polyadenylation, nucleus export and translation (see cartoon Fig. 7A). Once translated in the cytoplasm, the ectopic RNA must be associated to polysomes and should be co-purified with the ribosomal fraction.

To verify this, we have transfected different concentrations of the cDNA plasmid coding for  $\beta$ -globin-renilla into HeLa cells in culture. 48 hours after transfection, cytoplasmic RNA concentration was measured by quantitative RT-PCR and data are summarized in Fig. 7B. This shows a correlation between the amount of plasmid transfected (from 0.5; 6 and 12  $\mu$ g of input cDNA per 1,5.10<sup>7</sup> cells) and the concentration of neo-synthesized renilla-globin RNA found in the cytoplasm (Fig. 7B; from 0.010 picogrammes to 0.190 pg of RNA).

We next assembled the hybrid system by mixing these ribosome containing RNAs to the supernatant obtained from fractionation of the URRL. Upon reconstitution, the hybrid system was incubated for 30 minutes at 30 °C before quantification of luciferase activity (Fig. 7C). It can be observed that the production of luciferase correlated with the amount of RNAs quantified by quantitative RT-PCR. In order to rule out any possible interference with some luciferase protein that could have been co-purified with the HeLa ribosomes, we have added cycloheximide to the reconstituted system and this gave virtually no enzymatic activity under these experimental conditions (data not shown). This shows that the RNAs trapped into cellular polysomes are fully functional for translation upon their transfer to the hybrid reconstituted system.

This is a particularly attractive alternative to *in vitro* transcription as it ensures that the RNA of interest has been produced in its native environment (and as such, could be spliced) and has undergone the pioneer round of translation in the cytoplasm: these two steps being involved in the overall efficiency at which a mRNA is translated (Bedard et al, 2007; Maquat et al, 2010; Sanford et al, 2004). More recently, the importance of nuclear events in translation has also been evidenced in a viral system (Boeras et al, 2012).

To investigate the impact of nuclear genesis of an ectopic mRNA on translation, we have used the c-myc IRES as a model study. Expression from this IRES has been reported to be very inefficient in *in vitro* systems (Stoneley et al, 2000b) and this was explained by a need for this IRES to be transcribed and folded within the nucleus in order to acquire specific IRES Trans Acting Factors (ITAFs) that are needed for its activation (Stoneley & Willis, 2004).

Thus, the c-myc 5'UTR was a good tool to test our model and we first generated a capped and polydenylated c-myc driven renilla reporter RNA together with the globin-renilla control. Both were translated in the RRL (Fig. 7D) and it can be observed that production of luciferase under the control of the c-myc 5'UTR was about 10-fold lower than that from globin in agreement with the work of Willis and colleagues (Stoneley et al, 2000a). This sharply contrasts with expression from the corresponding plasmid cDNAs in HeLa cells which show a very good level of translation from the c-myc driven construct as previously described (Stoneley et al, 2000b). We then went on to isolate ribosomes from the cDNA transfected HeLa cells to supplement the supernatant obtained from URRL just as previously described (see above). The reconstituted system was incubated for 30 minutes at 30 °C before analysis of luciferase production (Fig. 7F). Interestingly, this showed that the c-myc derived constructs that co-sedimented with the HeLa ribosome pellet were efficient in the hybrid reconstituted system. In fact, we observed the same ratio between translational efficiency of globin/c-myc than that observed in HeLa cells upon cDNA transfection (Fig. 7E). This confirms the

adaptability of the hybrid translation system to recapitulate translational properties encountered in cultured cells.

### ***Translation in the hybrid system is sensitive to modified ribosomes***

A recent study has drawn our attention as they showed that chicken erythrocytic progenitors (T2EC) can be transformed by the v-erbA oncogene and this blocks differentiation in a state of self-renewal (Nguyen-Lefebvre et al, 2013). Such a change is accompanied by a major change in the composition of the large ribosomal subunit (60 S) as it generates an heterogeneous ribosomal subunit population with some of them devoid of RPL11. Remarkably, there is no change in the overall number of ribosomes. However, as a consequence, some changes in translation are observed, notably the upregulation of HSP70 (Nguyen-Lefebvre et al, 2013).

Thus, we wanted to investigate whether we could reproduce these results in the hybrid system. As it we have proceeded throughout this study, we have first performed the experiments in primary T2EC cells that we have transformed with a retrovirus carrying the v-erbA oncogene (XJ12) (Benchaiibi et al, 1989; Gandrillon et al, 1987) or a mutated inactive version of it (S61G) (Sharif & Privalsky, 1991) (Fig. 8A). 5 days post infection, the cells were used for RNA transfection of reporter genes bearing the luciferase gene under the control of the HSP70 or the Hepatitis C (HCV) 5'UTR. In parallel, a fraction of the T2EC cells were lysed and ribosomes were collected and used to assemble the hybrid system in which the same reporter genes (HSP70 and HCV) were translated. Results show translational activity of the reporter genes in cells (Fig. 8B) and in the hybrid system (Fig. 8C). It is interesting to note that these data confirm those obtained by Nguyen et al, showing that HSP70 translation is stimulated by about 1.8 fold in transformed T2EC cells (Nguyen-Lefebvre et al, 2013).



Remarkably, the same reporter gene was also stimulated by the same magnitude when it was translated in the hybrid system assembled with v-erbA transformed ribosomes (Fig. 8C). This confirms nicely the hypothesis of Nguyen et al, that ribosomal modification (e.g. the loss of RPL11) could favor translation of a specific set of mRNAs, including HSP70 (Nguyen-Lefebvre et al, 2013). In both cases, a control RNA containing the hepatitis C virus 5'UTR was only slightly affected by ribosome composition both *in vivo* and *in vitro*.

## DISCUSSION

Cell free protein synthesis systems (CFPS) are useful tools to rapidly (within an hour) and efficiently produce proteins with a pharmaceutical interest such as vaccine components and cytokines (Kanter et al, 2007; Yang et al, 2004; Yang et al, 2005; Zawada et al, 2011). They are also routinely exploited to perform ribosome display (Pluckthun, 2012) and high throughput production of protein libraries (Goshima et al, 2008). Above all, CFPS have been used in many ground breaking experiments such as the discovery of the genetic code (Nirenberg & Matthaei, 1961) and have been instrumental in deciphering many biological pathways involved in mRNA stability, processing, miRNA regulation and translation (Carlson et al, 2012). However, existing CFPS exhibit several limitations that restrict their use due to their lack of adaptability to the gene of interest. For instance, while the *E.coli*, wheat germ and insect cells are excellent tools to produce large amounts of a given protein, they are not adequate for studies of translation of mammalian RNAs (Carlson et al, 2012). Along the same line, whilst the rabbit reticulocyte lysate exhibits a good translational efficiency, it has often been criticized for the study of human genes or viral RNAs that infect humans as it may not contain all factors required for their expression (Borman et al, 1995; Borman et al, 1997; Stoneley et al, 2000b; Stoneley & Willis, 2004).

As an alternative, several *in vitro* translation systems based on extracts from mammalian cells, including human, have been developed over the last years (Bergamini et al, 2000; Svitkin & Sonenberg, 2004; Thoma et al, 2004; Witherell, 2001); recently Pierce has even commercialized a HeLa based translation system (Fig. 1). Whilst all these systems are faithful to recreate a competitive cellular environment, they are usually tedious to make and quite inefficient in terms of the yield of protein produced (Fig.1). In addition, they are made from

one cell type (mostly HeLa cells) and are not physiologically relevant to study translation of RNAs that exhibit a specific cellular tropism.

This provided the rationale to develop a novel adaptable CFPS based on the reticulocyte lysate (depleted from its ribosomes) that are complemented with exogenously added ribosomes that can be isolated from any cell types or even isolated from different organs (Fig. 2). Such a system retains the good translational efficiency of the RRL and exhibits translational characteristics of the cells from which the ribosomes are derived (Fig. 2). This system recapitulates well the cap/poly(A) synergy observed in living cells (Fig. 3) and can translate both cistrons of a bicistronic RNA (Fig.3).

Proof of concept was demonstrated by showing efficient translation of specialized RNAs such as those derived from the poliovirus (Fig.4) and the cricket paralysis virus (Fig. 3). Moreover, by using C2C12 mouse myoblastic cells to which horse serum was added to induce differentiation into myotubes as previously described (Kubo, 1991), we could demonstrate that the hybrid system can reproduce the effects of cell differentiation (Fig. 5).

By design, our system also allows to manipulate the level of endogenous proteins by the use of RNA interference (Fig. 6). In addition, the hybrid lysate can be programmed with *in cellulo* produced RNAs. This does not only skip the tedious *in vitro* transcription step, but it also allows to study translational features of a given mRNA that has been produced and processed by the cellular machinery. This is of primary importance given the fast growing literature suggesting the impact of the RNP on translational control (Huang & Steitz, 2005; Moore, 2005). As such, we have obtained data by using a c-myc derived RNA that confirms nicely this assumption (Fig. 7).

Finally, we have successfully demonstrated that the hybrid system was sufficiently sensitive to recapitulate modifications in the composition and structure of the ribosome that only

slightly affect translation. This was done by studying the effects of v-erbA induced transformation in T2EC cells that results in the loss of RPL11 (Nguyen-Lefebvre et al, 2013). However, this only occurs in a sub-population of 60 S ribosomal subunits and this only upregulates HSP70 by 1.8 fold in transformed cells. Remarkably, translation in the hybrid system assembled from v-erbA transformed cells recapitulated faithfully results obtained in T2EC cells, thus showing that minor differences in translation can be recapitulated in the hybrid system and that it can also be used to study the impact of ribosomal modifications (Fig. 8).

Therefore, this adds to the growing evidences that ribosomes are not homogenous within the cell and that they may be specialized for translation of a subset of mRNAs (Kondrashov et al, 2011; Xue & Barna, 2012). Therefore, the hybrid *in vitro* system could be the perfect tool to assess such an hypothesis and can be used to identify and characterize these transcripts.

## Materials and Methods

### *DNA constructs*

The globin, GAPDH, PV, HIV1, c-myc and HSP70 5'UTR, HCV, CrPV, and Utrophin IRES were obtained by PCR using the p0-glo-renilla, p0-GAPDH-renilla p0-EMCV-renilla, p0-PV-renilla, p0-HIV1-renilla, p0-HCV-renilla, p0-CrPV-renilla (Soto Rifo et al, 2007), c-myc pRMF (Evans et al, 2003), pGL4.14CMV 5'UTR mUTROPHIN (Miura et al, 2005) respectively using specific primers containing PvuII restriction site and T7 promoter and HpaI restriction site (for sense primers) and BamHI restriction site (for antisense primers). PCR products were digested and cloned in p1-renilla and pCDNA3.1-renilla backbone vectors previously digested by PvuII and BamHI or HpaI and BamHI restriction enzymes respectively. Our pCDNA3.1 vector was modified after the CMV promotor to minimize the number of nucleotides added upstream of the 5'UTR. Position of the +1 transcription site was controlled by rapid amplification of cDNA extremity (RACE) (Ambion kit). P1-bicistronic construction was cloned with the combination of the simple digest p0- $\beta$ -globin-firefly vector (AflIII restriction site) and EMCV-renilla insert obtained by PCR using the p1-EMCV-renilla.

pRS-shCtrl and pRS-shDDX3 vectors were respectively generated by a 5'-**GCAGCACGACTTCTTCAAGTTCAAGAGACTTGAAGAAGT** CGTGCTGC-3' and 5'-**GATGCTGGCTCGTGATTTCTTTCAAGAGAAGAAATCACGAGCCAGCATC**-3' (target sequence in bold) insertion between the BglII/HindIII sites of the pRetroSuper vector (OligoEngine) following supplier's instructions.

### *In vitro transcription*

RNAs were transcribed using the T7 RNA polymerase from templates linearized either at the AflIII for Polyadenylated RNAs or at the EcoRV sites for non-polyadenylated RNAs. Uncapped RNAs were obtained by using 1 $\mu$ g of linear DNA template, 20U of T7 RNA

polymerase (Promega), 40U of RNAsin (promega), 1,6mM of each ribonucleotide triphosphate, 3mM DTT in transcription buffer (40mM Tris-HCl (pH 7,9), 6mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM spermidine and 10mM NaCl). For capped mRNAs, the rGTP concentration was reduced to 0,32mM and 1,28mM of m<sup>7</sup>GpppG cap analogue (New England Biolabs) was added. The transcription reaction was carried out at 37°C for 2h and the mRNAs were precipitated with ammonium acetate at 2,5M final concentration. The RNA pellet was then resuspended in 30μL RNase free water and RNA concentration was determined by absorbance using Nanodrop technology. RNAs integrity was checked by electrophoresis on non-denaturing agarose gel.

### **Cell culture and nucleic acid transfections**

Hela, C2C12, BHK and Jurkat cells were obtained originally from American Tissue Type Culture Collection. Mouse stem cells were kindly donated by D.Aubert (IGF-Lyon, France).

Hela, BHK and C2C12 cells were typically grown in DMEM containing 10% fetal calf serum (FSC) supplemented with 50U/ml of penicillin, 50μg/ml of streptomycin (PS) under a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. C2C12 differentiation is induced by DMEM containing 2% horse serum. Jurkat cells were grown in (RPMI) containing 10% FSC supplemented with 50U/ml of penicillin, 50μg/ml of streptomycin, 10mM Hepes (pH 7,2-7,5), 2mM L-Glutamine and 1mM pyruvate under a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. T2EC cells were expanded as described previously (Gandrillon et al, 1999). Mouse stem cells were grown in GMEM containing 10% FSC supplemented with 50U/ml of penicillin, 50μg/ml of streptomycin, 1% MEM unessential amino acids (Gibco), 1mM sodium pyruvate, 2mM L-Glutamine, 40μM β-mercaptoethanol and 400 μL Leukemia inhibitory factor (LIF) (Chemicon) under a humidified atmosphere containing 7,5% CO<sub>2</sub> at 37°C. For DDX3 knock-down, stable clone of Hela cells were obtained by transfecting the pRS-shCtrl

or pRS-shDDX3 vectors that were maintained and selected in DMEM growth media supplemented with 1µg/mL puromycin, 10% FSC and 1% PS.

### **Viral transfection**

T2EC were expanded and infected with a viral supernatant from XJ12 (Benchabi et al, 1989; Gandrillon et al, 1987) and S61G (Sharif & Privalsky, 1991) and maintained for 5 days in the presence of G418 (3mg/ml).

### **DNA transfection**

Hela cells were transfected with 12µg of total DNA containing 500ng, 6µg or 12µg of interest plasmid DNA per 175cm<sup>2</sup> containing  $1.5 \cdot 10^7$  cells using cationic polymers (JetPEI from Polyplus) as specified by the manufacturer. Cells were lysed 36 h after transfection either to determine luciferase activity or to pellet and isolate the ribosomes as indicated in the manuscript (see below).

### **RNA transfection**

Hela, C2C12, T2EC and BHK cells were electroporated with 100ng of *in vitro* synthesized mRNAs (see below) for  $10^5$  cells with the Neon<sup>TM</sup> system (life technology) following supplier's indications. Cells were lysed 1h after transfection and luciferase activity was determined.

### **Ribosome purification**

All following steps were performed at 4°C

***S10 preparation*** : The pellet of  $10^8$  cells was diluted in an isovolume of lysis buffer (buffer R: Hepes 10mM, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K 10mM, (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Mg 1mM, DTT 1mM). The cell suspension

was homogenized by potter and centrifuged at 16 000 g for 10mn to yield the S10 supernatant extract.

***Ribosomal fraction:*** 300µl of S10 preparation was centrifuged through a sucrose cushion (1M sucrose in buffer R) for 2h15 at 240 000 g. After removal of the sucrose solution, the resulting pellet is gently rinsed in buffer R2 and resuspended in buffer R2 (buffer R2: Hepes 20mM, NaCl 10mM, KCl 25mM, MgCl<sub>2</sub> 1,1mM, β-mercaptoethanol 7mM) and stored at -80°C.

***Fractionation of the reticulocyte lysate :*** After centrifugation of 1ml of URRL/RRL, 950 µl of post-ribosomal supernatant is collected, frozen and stored at -80° C. The ribosomal pellet is rinsed in buffer R2 and resuspended in buffer R2 as above.

#### **Preparation of URRL and *in vitro* translation assays**

The method used was identical to that described (Soto Rifo et al, 2007) and can be briefly summarized as follow: 1ml of untreated RRL (URRL) was supplemented with 25µM Hemin (Fluka), 25µg creatine phosphokinase (Sigma Aldrich), 5mg creatine phosphate (Fluka), 50µg of bovine liver tRNAs (Sigma Aldrich) and 3mM of D-glucose (Sigma Aldrich).

For reconstitution of the hybrid system, 5µl of S100 supernatant isolated from RRL or URRL as indicated on the figure was mixed with 1µg of C100 derived from cultured cells (HeLa, Jurkat, BHK, C2C12, mouse stem cells) or reticulocyte lysate (RRL or URRL).

*In vitro* transcribed RNAs were translated at 2,7 nM unless specified in the figure legend in a final volume of 10µl of lysate (either crude or reconstituted as indicated on figures) supplemented with 75mM KCl, 0,75mM MgCl<sub>2</sub>, 20µM amino acids mix. The translation reaction is left incubated for 30mn at 30°C before the reaction is stopped by addition of renilla lysis buffer (Promega). When adequate, [<sup>35</sup>S]-methionine labeled radioactive proteins were translated in presence of 20µM of amino acids mix minus methionine and 5µCi of [<sup>35</sup>S]-



methionine (Perkin Elmer) for 30 mn before the reaction was stopped by addition of SDS loading buffer.

### **Preparation of L-protease**

The L-protease from the foot and mouth disease virus (FMDV) or GFP for control was produced by *in vitro* translation using RRL as previously described (Ohlmann & Jackson, 1999) and 0,1 µl (per 10 µl final volume of lysate) was added and incubated for 10 mn at 30°C prior to the start of the translation reaction.

### **Western blot**

Samples were resolved on a 10% or 12% SDS-PAGE, transferred to PVDF membrane and blotted using anti DDX3 (Abcam), eIF4G (kindly provided by Dr. Simon Morley, University of Sussex, United Kingdom).

### **Renilla activity**

Renilla activity was measured using the renilla luciferase Assay System (Promega Co, Madison, WI, USA) in a Mithras (Berthold technologies) with 50µl substrate injection and 10 seconds of signal integration program.

### ***RNA extraction and RT-qPCR***

Cytoplasmic RNA extraction and RT-qPCR was performed as previously described (Ricci et al, 2011).

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors wish to thank D.Aubert (IGF-Lyon, France) for the kind gift of mouse stem cells used in this study and c-myc pRMF was generously send by A.E. Willis. This work was supported by grants from the ANRS and Baptiste Panthu holds a PhD fellowship from the Région Rhône-Alpes.

## Figure legends

### **Figure 1. *Translational efficiency in different in vitro system.***

Capped and polyadenylated *in vitro* transcribed RNA with the 5'UTR of  $\beta$ -globin (A) and (C) or GAPDH (B) upstream of the renilla luciferase was added to the following *in vitro* systems: Untreated Rabbit Reticulocyte Lysate (URRL), nuclease-treated Rabbit Reticulocyte Lysate (RRL), Wheat Germ Lysate (WG) and Human cell free system (HL) at the concentrations indicated on each panel. Translation was carried out for 30 minutes at 30°C before determination of renilla activity as described in Materials and Methods. Results are presented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

### **Figure 2. *Design and elaboration of a reconstituted in vitro translation system.***

(A) Schematic diagram of the experimental procedure used to fractionate the reticulocyte lysate. Briefly, it consists of isolating the ribosome—fraction from the postribosomal supernatant by ultracentrifugation of RRL or URRL as depicted. The ribosomal fraction Rurrl (if obtained from URRL) or Rrrl (if obtained from RRL) is resuspended in buffer as described in Materials and Methods and the reconstituted lysate is assembled by mixing Su (if obtained from URRL) or Sr (if obtained from RRL) with the resuspended ribosomal fraction.

(B) Following the experimental procedure described above, homogeneous (Su+Rurrl; and Sr+Rrrl) or heterogeneous (Su+Rrrl; Sr+Rurrl) combinations were assembled and used for translation of the  $\beta$ -globin-renilla mRNA together with parental lysates (RRL and URRL). Su and Sr represent the reticulocyte supernatants after centrifugation with no added ribosomes. Values of the luciferase activity are given in arbitrary units and presented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

(C) This represents the translational efficiency obtained from the  $\beta$ -globin-renilla construct translated in a reconstituted URRL (Su+Rrrl) that has been assembled with various concentrations of resuspended ribosomes: from 0,01X to 0.5 X. (D) Schematic diagram for the elaboration of the hybrid reconstituted lysate. The same experimental procedure as described above is applied to a cell extract to isolate the ribosomal fraction. A hybrid reconstituted system is then assembled with the supernatant from the URRL (Su) mixed with resuspended ribosomes from cells. (E) The post-ribosomal supernatant from the untreated RRL (Su) was used in combination with ribosomes isolated from HeLa cells (Rh), Jurkat (Rj), RRL (Rrrl), untreated RRL (Rurrl) or wheat germ (Rwg) as indicated on the figure. The  $\beta$ -globin-renilla mRNA was then translated for 30 minutes in all combinations described above and in the untreated RRL as control. Values of the luciferase activity are given in arbitrary units and presented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments. (F) As above, ribosomes isolated from mouse stem cells (Rsc) were also used with the supernatant from the untreated RRL. Translation of the  $\beta$ -globin-renilla mRNA was carried out for 30 minutes at 30°C before determination of renilla activity as described in Materials and Methods. Results are presented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments. (G) Different reporter mRNA constructs including firefly, renilla luciferase and GFP coding region were translated in the hybrid system in the presence of labeled [ $^{35}$ S]-methionine. Protein products were resolved on a 12 % SDS-PAGE and subjected to autoradiography. The position of the neo-synthesized polypeptides and the MW markers are indicated. (H) The globin renilla reporter construct was used at different concentrations to program the Human lysate (Pierce) or the hybrid system as indicated on the figure. At the end of a 30 minutes incubation, expression of luciferase was determined and presented as mean  $\pm$  SD of two independent experiments realized in duplicates. The bottom panel summarizes the results and is plotted in a log. scale.

**Figure 3. *In vitro* hybrid system recapitulates cap/poly(A) synergy.**

(A) Schematic representation of the RNAs used, the presence of the cap and poly(A) being indicated as +/+. (B) *In vitro* transcribed RNAs depicted above were used to program the RRL and the hybrid system composed of the URRL supernatant with ribosomes isolated from HeLa (Su+Rh) as indicated on the figure. Translation of the globin-renilla mRNA was carried out for 30 minutes at 30°C before determination of renilla activity as described in Materials and Methods. Results are expressed as mean +/- SD of three independent experiments. For clarity, a blow up picture of the values obtained with the glo -/- has been inserted below the graph. (C) The dual renilla luciferase bicistronic construct in which the EMCV IRES was inserted in the intercistronic spacer was translated in the Su+Rh hybrid system, the RRL and the WG lysates. Both firefly and luciferase activities were determined after 30 minutes of incubation and are presented in separate graphs. Data are presented as mean +/- SD of three independent experiments. (D) Autoradiogram showing the production of both firefly and renilla luciferase from translation of the construct depicted above. The resulting mRNAs were expressed in the RRL (1 and 2) or the hybrid system (3 and 4) in the presence of L protease as indicated on the figure. Positions of the [<sup>35</sup>S]-methionine labeled reporter genes are indicated on the left handside of the figure. (E) Luciferase production from RNA constructs containing the CrPV (left panel) or the globin (right panel) 5'UTRs was measured in the hybrid system that had been assembled with ribosomal pellets isolated under different KCl concentrations ranging from 25 mM to 500 mM as indicated on the figure. Data are presented as mean +/- SD of three independent experiments

**Figure 4. Recapitulation of the PV IRES cell tropism.**

(A) *In vitro* transcribed RNAs with the  $\beta$ -globin or the poliovirus 5'UTRs upstream of the renilla luciferase were translated in the RRL or a hybrid system assembled with HeLa ribosomes (Su+Rh). The results are expressed as a % of control which is represented by the value obtained for the globin-renilla construct in both RRL and Su+Rh and set to 100 %. (B) *In vitro* transcribed RNAs described above were electroporated in BHK cells for 1 h before determination of the luciferase activity. The result is expressed as a % of control (globin), which was set to 100 %.

(C) *In vitro* transcribed RNAs described above were translated in the hybrid system assembled with BHK ribosomes (Su+Rbhk). The result is expressed as a % of control (globin), which was set to 100 %. Results are presented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

**Figure 5. The effects of cell differentiation can be mimicked in the hybrid system.**

*In vitro* transcribed capped and polyadenylated RNA with the  $\beta$ -globin, GAPDH or Utrophin 5'UTRs upstream of the renilla luciferase were transfected by electroporation in undifferentiated and differentiated C2C12 cells as indicated. 1h after RNA transfection, cells were lysed and translation of the globin-renilla (Glo), GAPDH-renilla (GAPDH) or Utrophin-renilla (Utro) mRNAs was determined by measure of the renilla activity as described in Materials and Methods. Results are presented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments. For clarity, a blow up picture of the values obtained with the Utro construct has been inserted below the graph. (B) The hybrid system was assembled with supernatant from URRL (Su) with ribosomal fractions obtained from undifferentiated or differentiated C2C12

cells and used for translation of the Glo, GAPDH or Utr mRNA as indicated. Data are presented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

**Figure 6. Efficient depletion of an endogenous protein.**

(A) Western blot analysis of a S10, S100 and ribosomal (C100) fractions of HeLa cells that have been treated with shRNAs directed against GFP (control) or the DDX3 protein. Antibody recognizing DDX3 has been used to probe the membrane. (B) *In vitro* transcribed capped and polyadenylated RNA with the  $\beta$ -globin or HIV-1 5'UTRs upstream of the renilla luciferase were transfected by electroporation in control or ShDDX3 treated HeLa cells as indicated. 1h after RNA transfection, cells were lysed and translation of the globin-renilla (Glo) or HIV-1-renilla (HIV) mRNAs was determined by measure of the renilla activity as described in Materials and Methods. Results are presented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments. (C) The hybrid system was assembled with supernatant from URRL (Su) with ribosomes obtained from control or ShDDX3 cells and used for translation of the Glo and HIV-1 renilla-luciferase mRNAs as indicated. Data are presented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

**Figure 7. Translation from RNAs produced by the cellular machinery.**

(A) Schematic representation of the pathway used for RNA synthesis. (B) Quantification by quantitative RT-PCR of the cytoplasmic RNAs resulting from transfection of 500ng, 6 $\mu$ g or 12 $\mu$ g of  $\beta$ -globin-renilla cDNA. (C) The hybrid system was obtained by mixing the Su with ribosomes isolated from HeLa cells that had been preably transfected with 500 ng, 6  $\mu$ g or 12  $\mu$ g of globin renilla cDNA (as indicated). Once assembled on ice, the mixture has been incubated for 30 mn before measuring the luciferase activity. Results are presented as mean

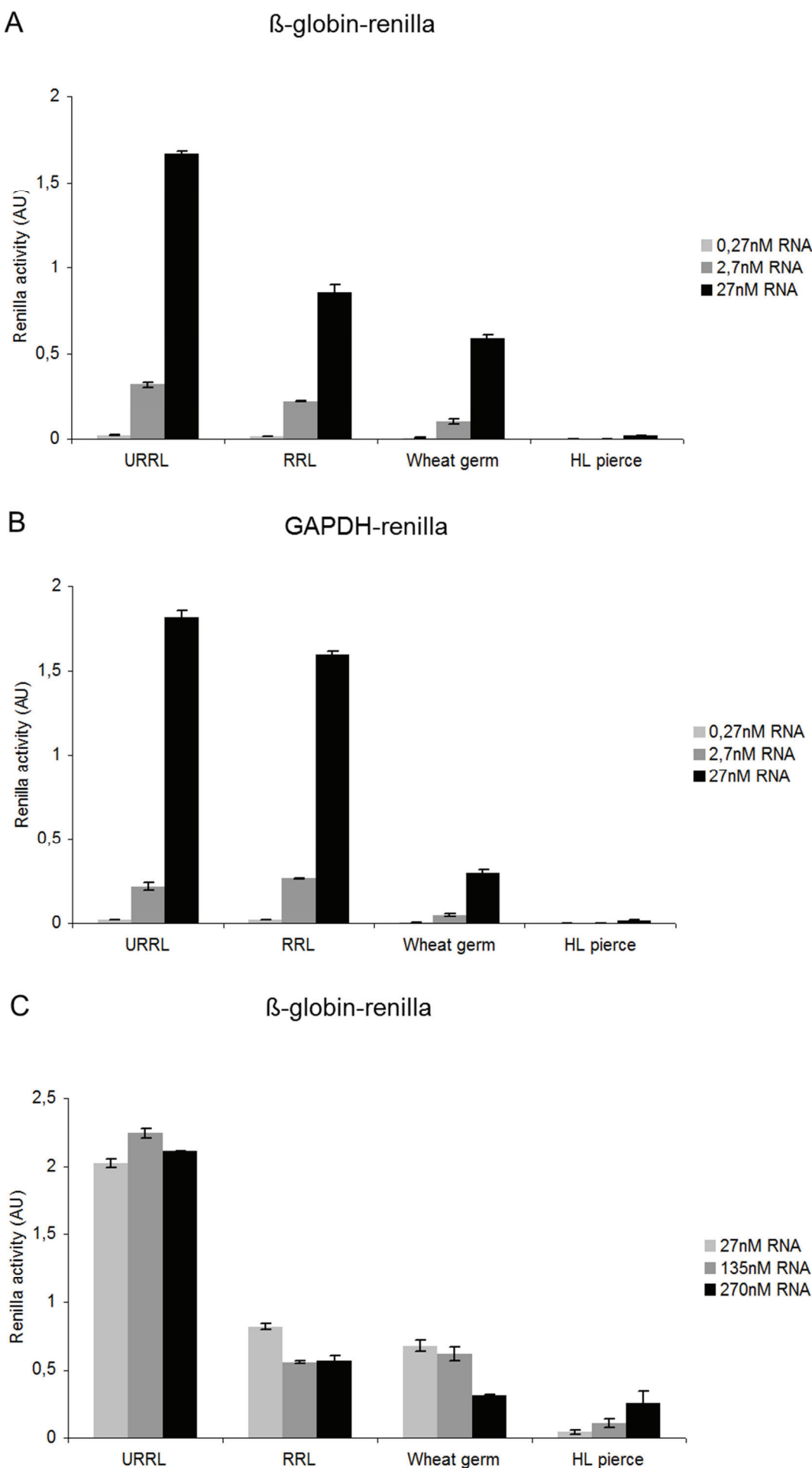
+/- SD of three independent experiments. (D) Capped and polyadenylated *in vitro* transcribed RNAs with the  $\beta$ -globin or the c-myc 5'UTRs upstream of the renilla luciferase were added to the RRL. Translation was carried out for 30 minutes at 30°C before determination of renilla activity as described in Materials and Methods. (E) cDNA coding for  $\beta$ -globin or the c-myc 5'UTRs upstream of the renilla luciferase was transfected in HeLa cells. Cells were lysed 36 hours post-transfection renilla activity was determined. (F) Hybrid system constituted from Su mixed with ribosomes isolated from HeLa cells that had been preably transfected with cDNA coding for the renilla luciferase driven by the globin or c-myc 5'UTRs (as indicated). Once assembled on ice, the mixture was incubated for 30 min before measuring luciferase activity. Results are presented as mean +/- SD of three independent experiments.

**Figure 8. Ribosomes devoid of RPL11 can upregulate translation of HSP70.**

(A) Schematic representation of the pathway used for transformation of T2EC cells by *v-erbA*. (B) *In vitro* transcribed capped and polyadenylated RNA with the HSP70 or HCV 5'UTRs upstream of the renilla luciferase were transfected by electroporation in *v-erbA* (XJ12), or an inactive mutated version of it (S61G), transformed T2EC cells as indicated. 1h after RNA transfection, cells were lysed and translation of the HSP70-renilla (HSP70+/+) or HCV-renilla mRNAs (HCV-/-) was determined by measuring renilla activity as described in Materials and Methods. Results are presented as mean +/- SD of three independent experiments. (C) The hybrid system was assembled with supernatant from URRL (Su) with ribosomes obtained from XJ12 or S61G T2EC cells and used for translation of the HSP70 and HCV renilla-luciferase mRNAs as indicated. Data are presented as mean +/- SD of three independent experiments.



Figure 1



# Figure 2

A

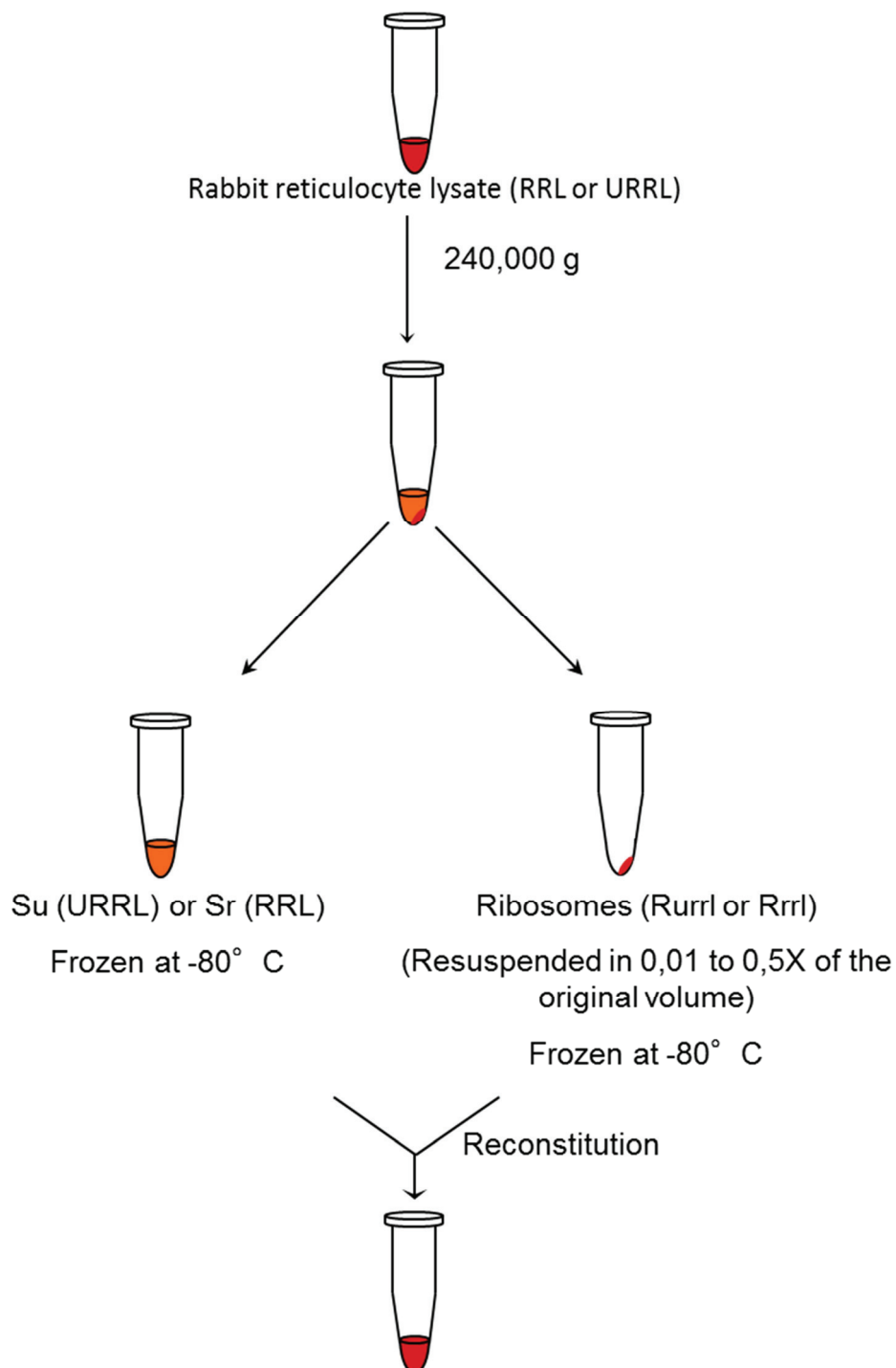


Figure 2

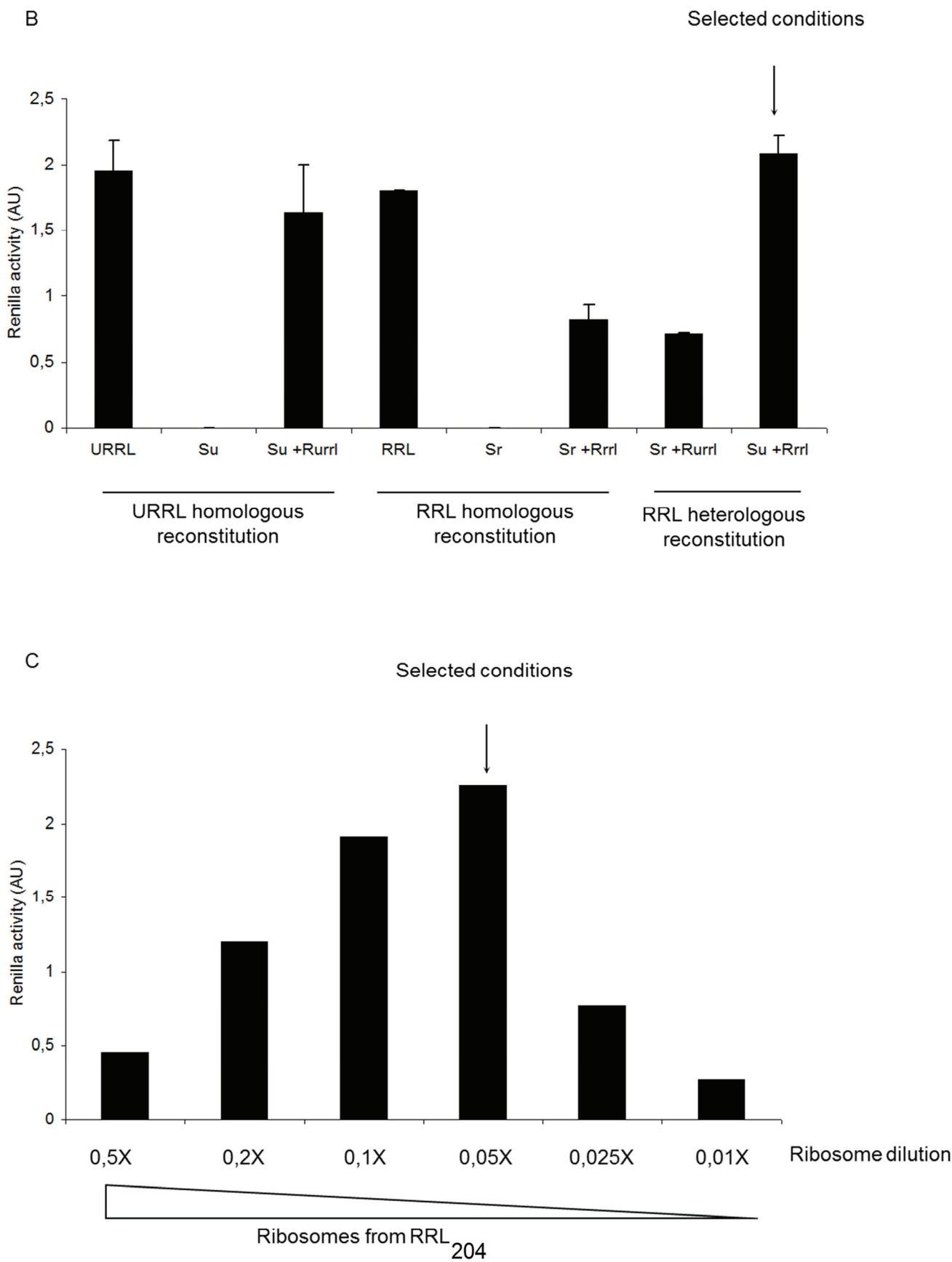
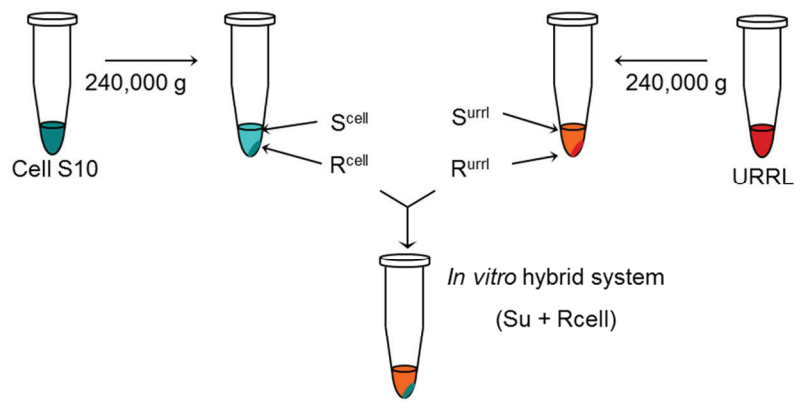
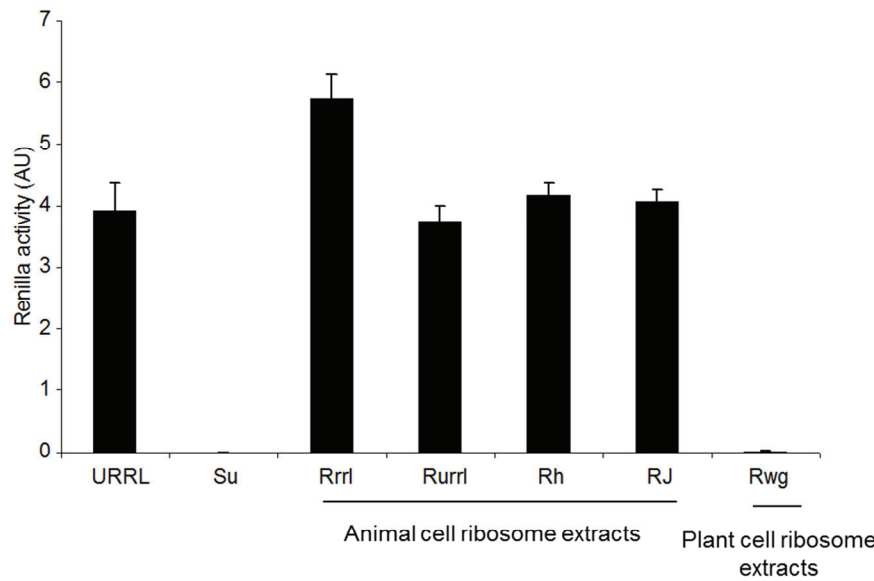


Figure 2

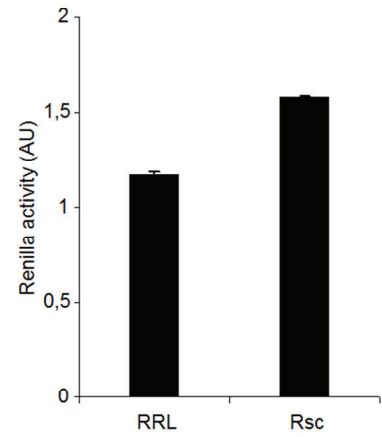
D



E



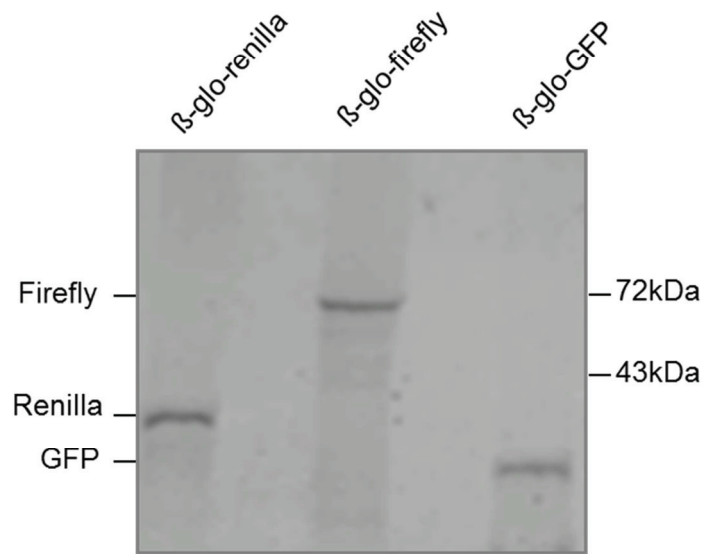
F



# Figure 2

G

Hybrid system



H

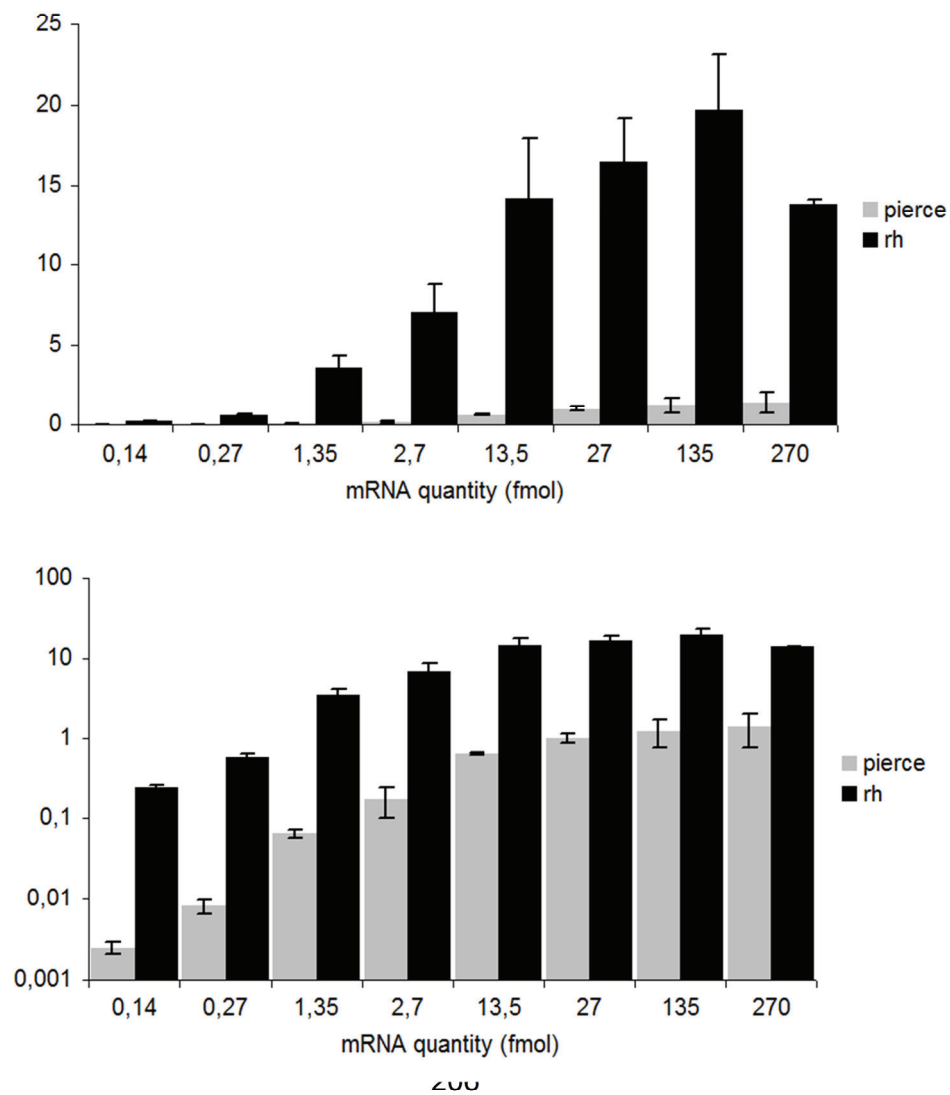
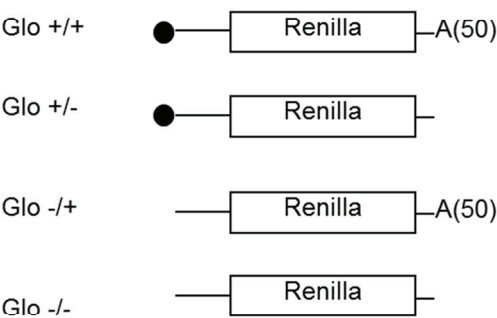


Figure 3

A



B

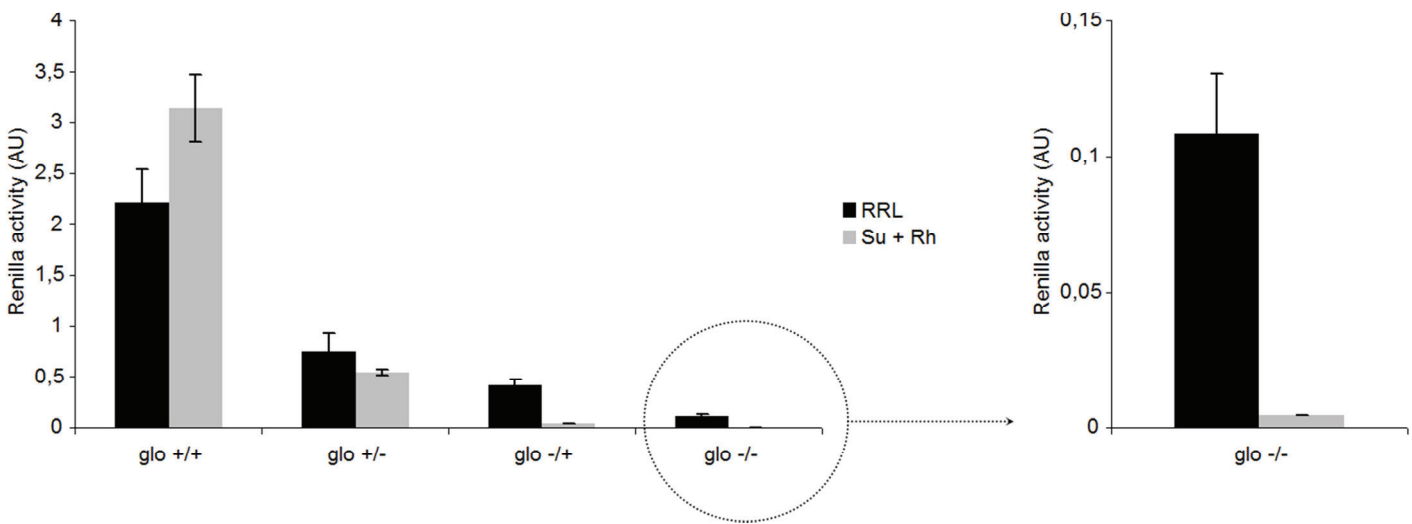


Figure 3

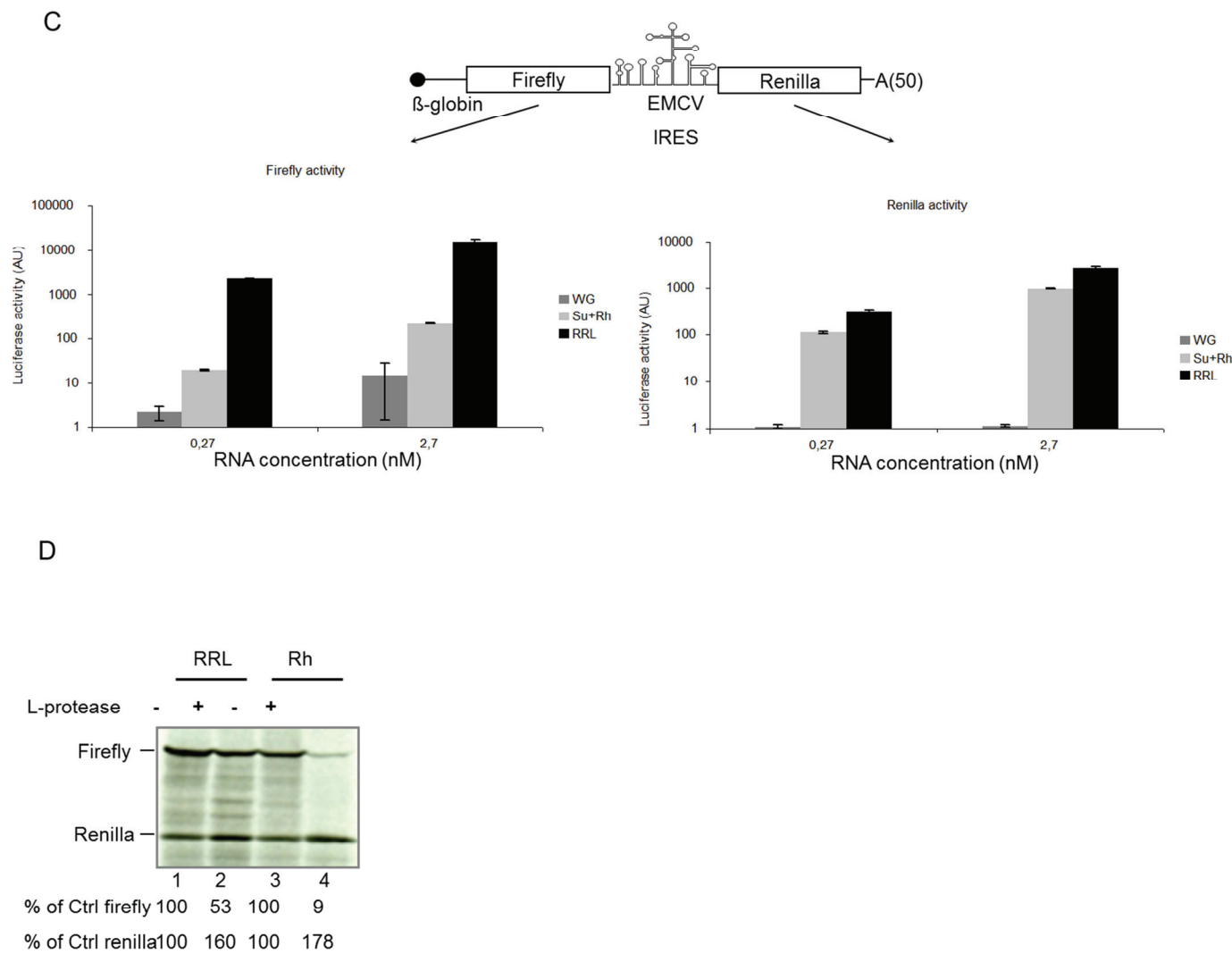
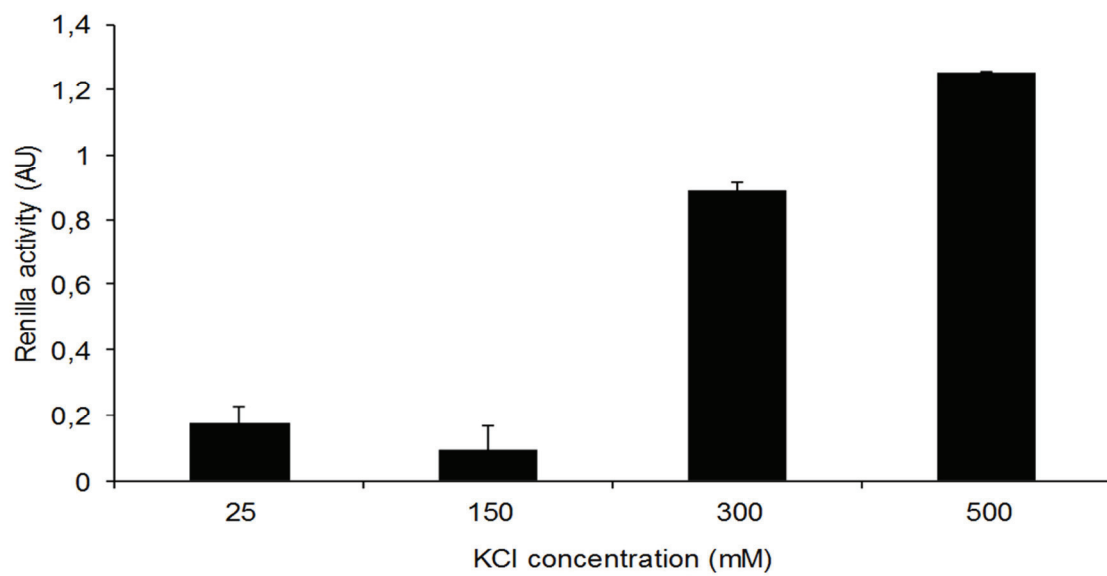


Figure 3

E

CrPV-renilla



F

$\beta$ -globin-renilla

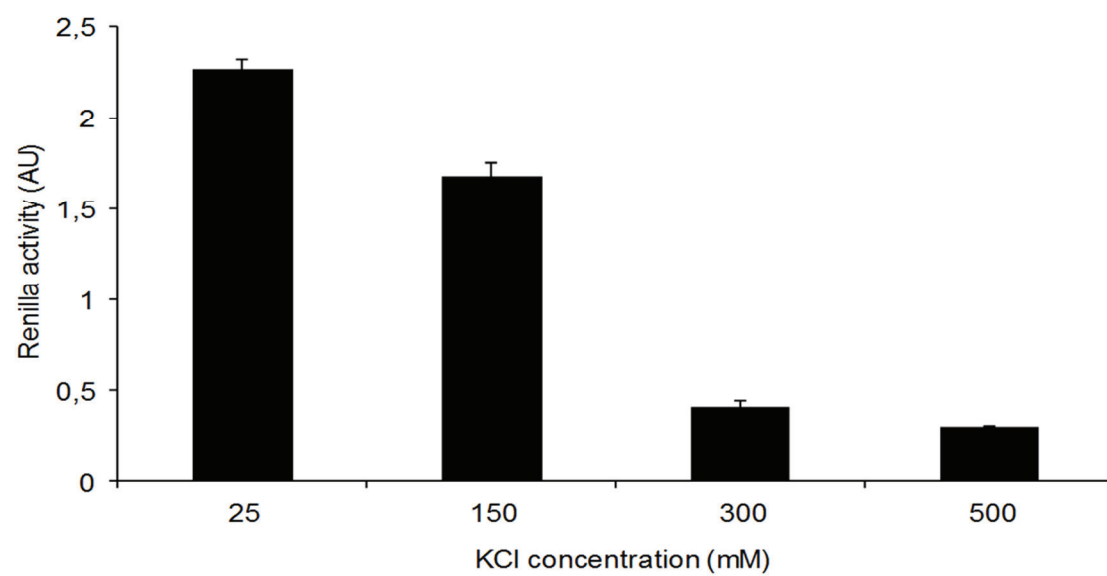




Figure 4

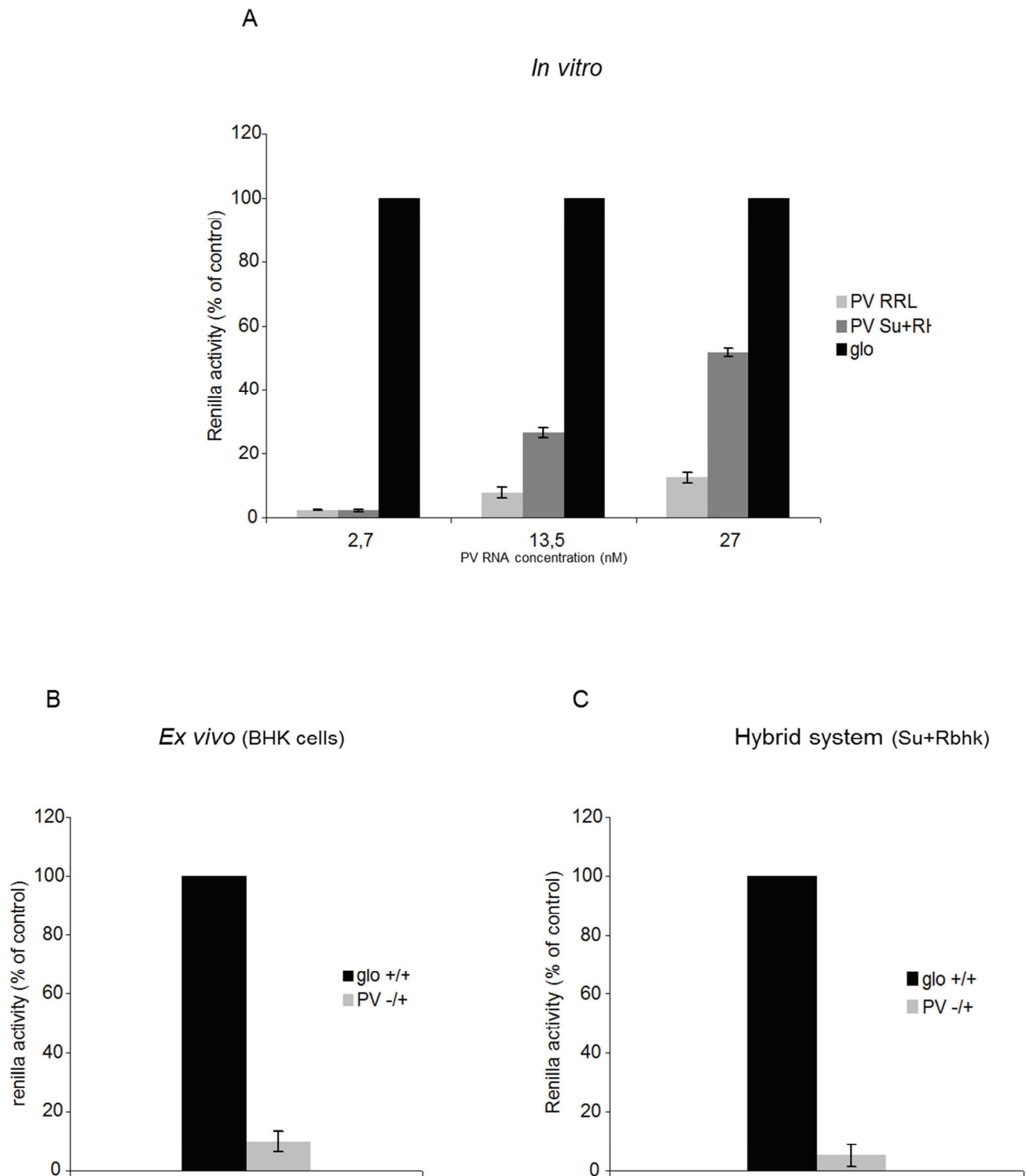


Figure 5

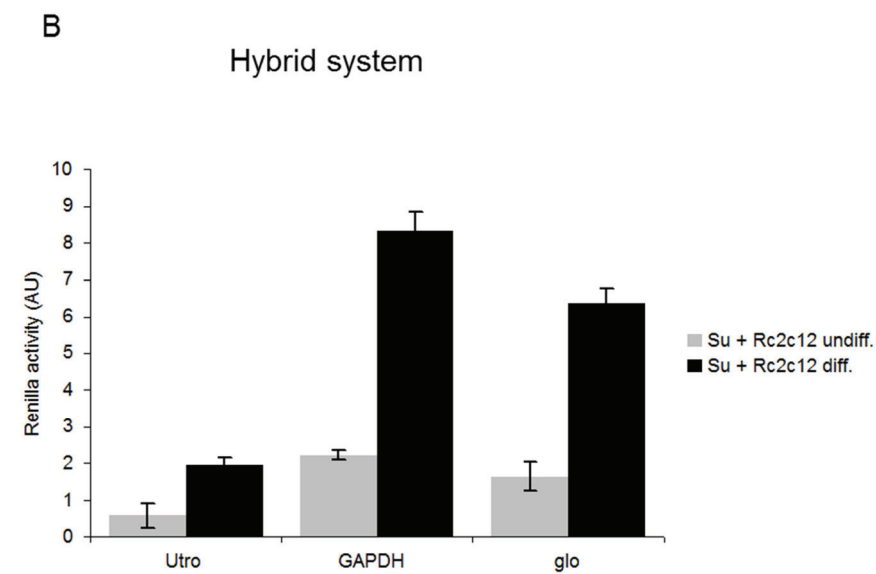
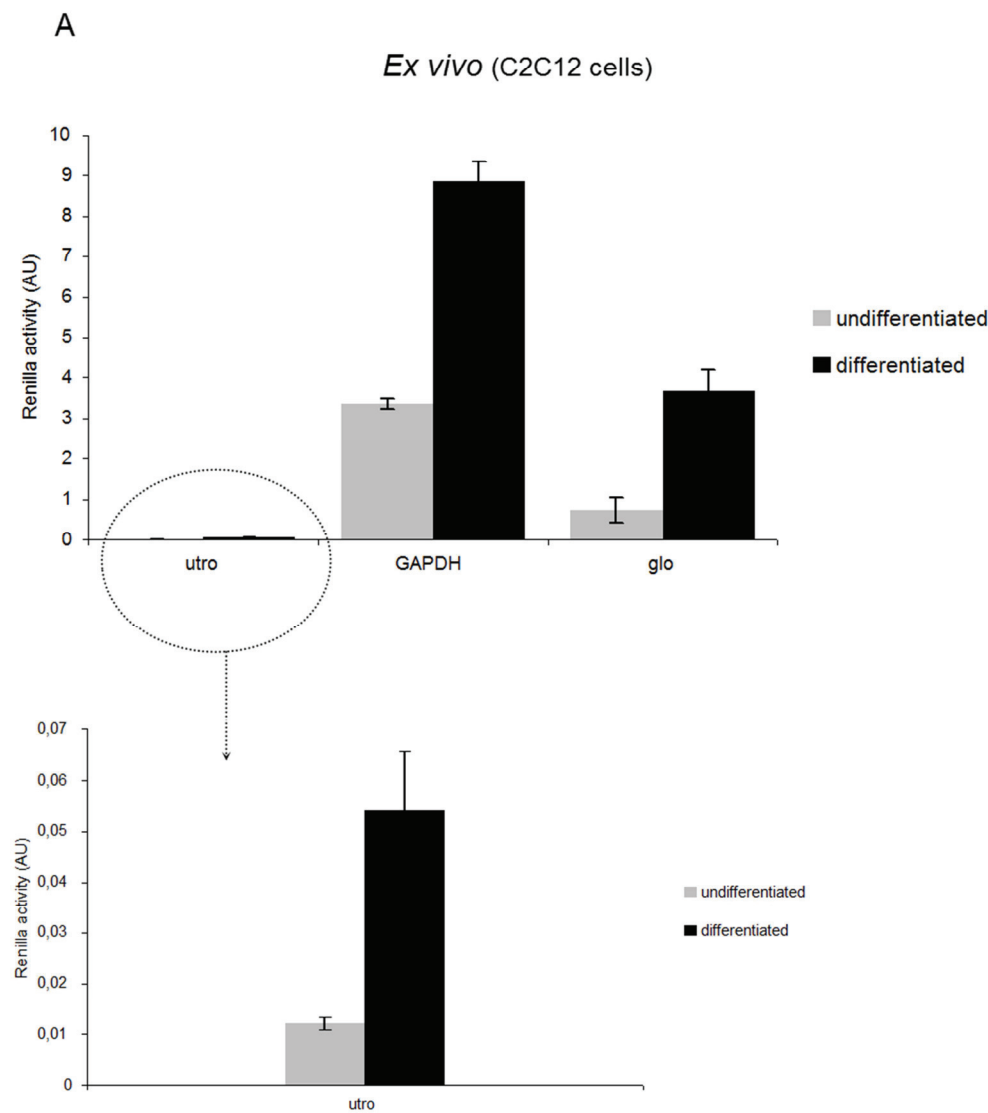
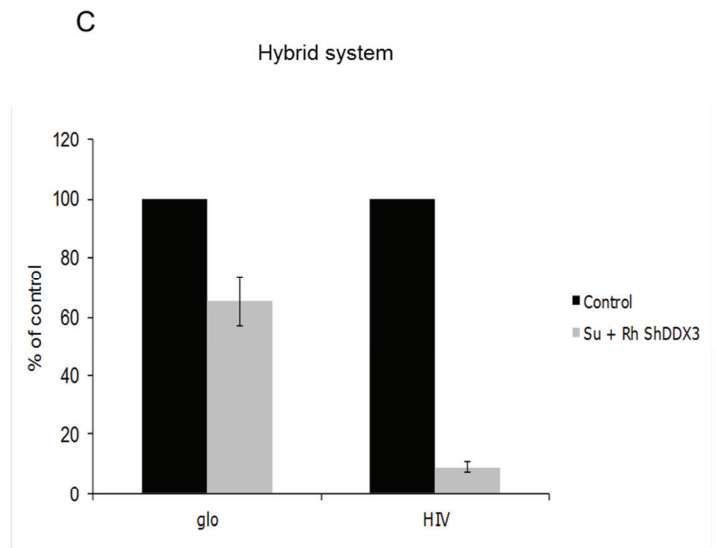
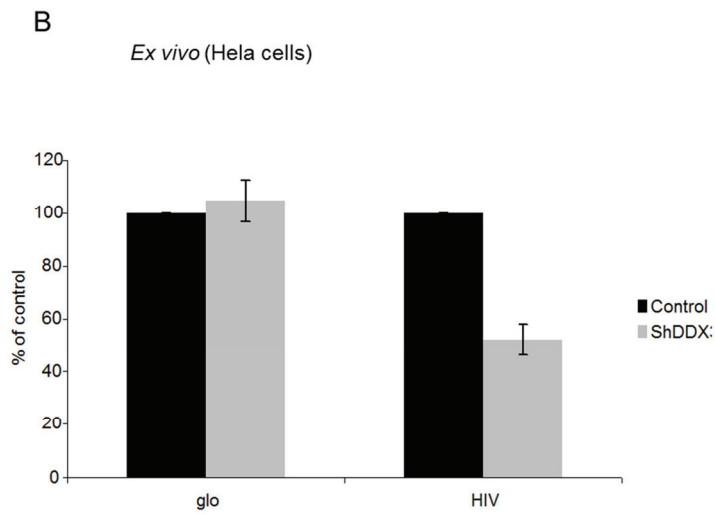
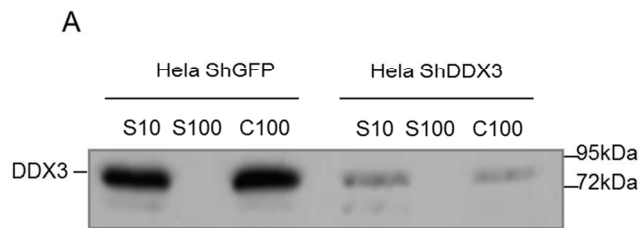
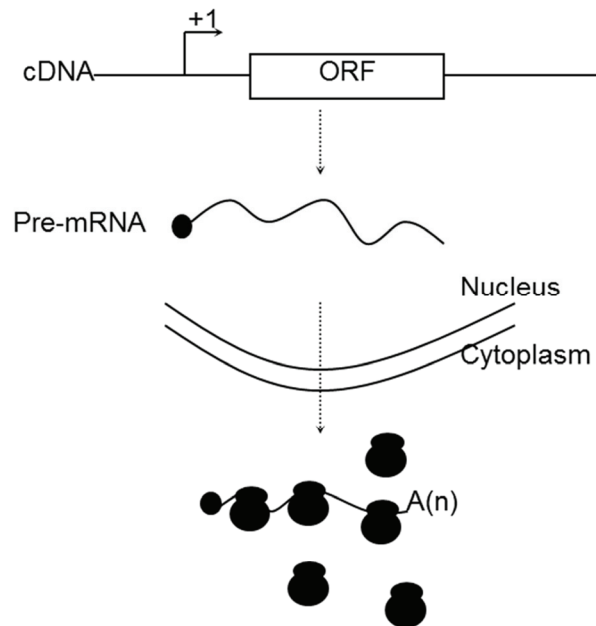


Figure 6

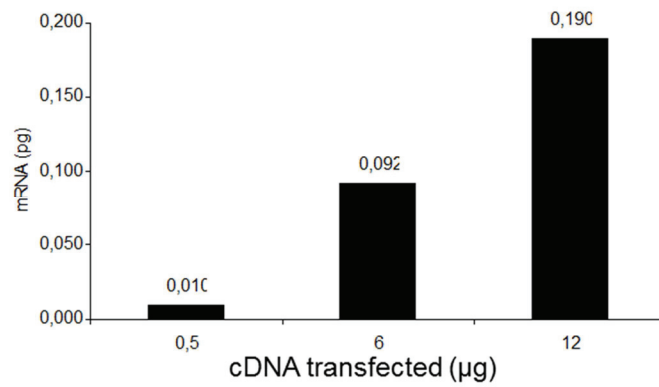


# Figure 7

## A *Ex vivo* transcribed mRNAs



## B mRNA quantification



## C Hybrid system

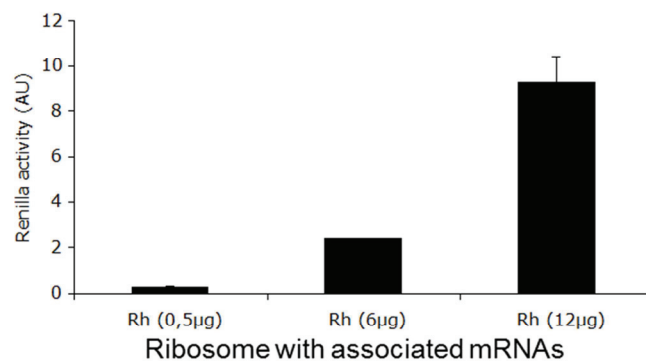


Figure 7

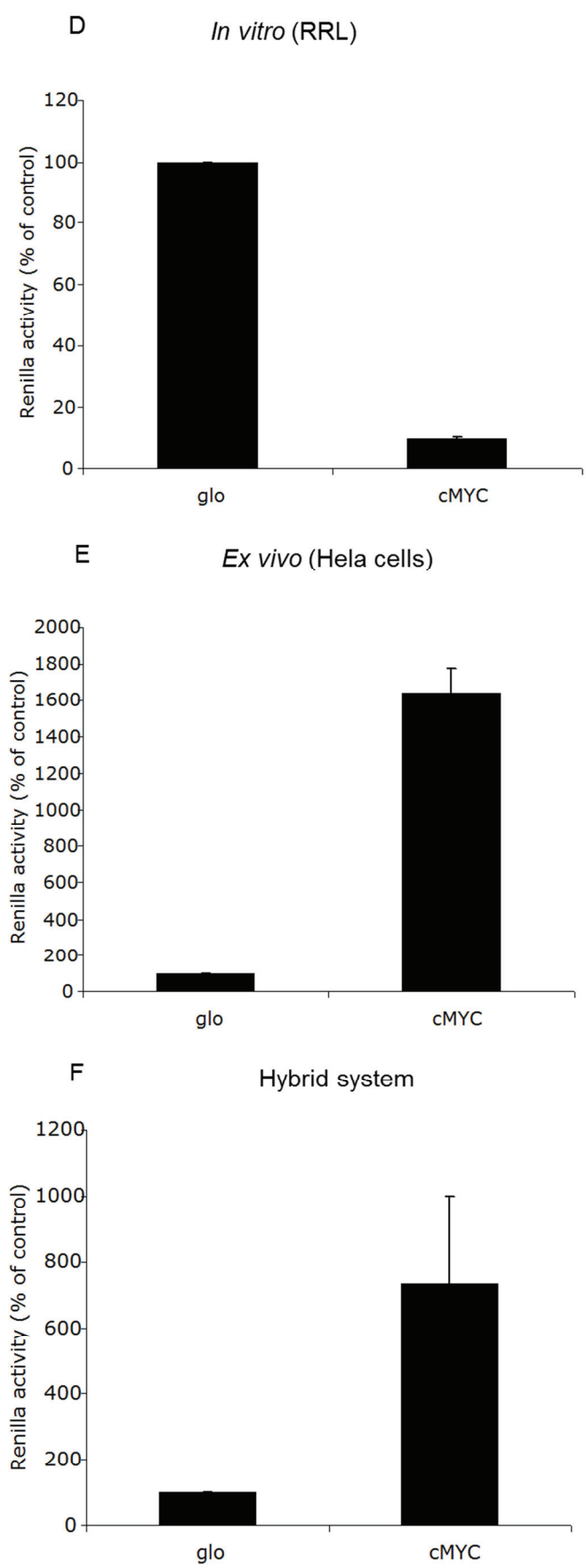
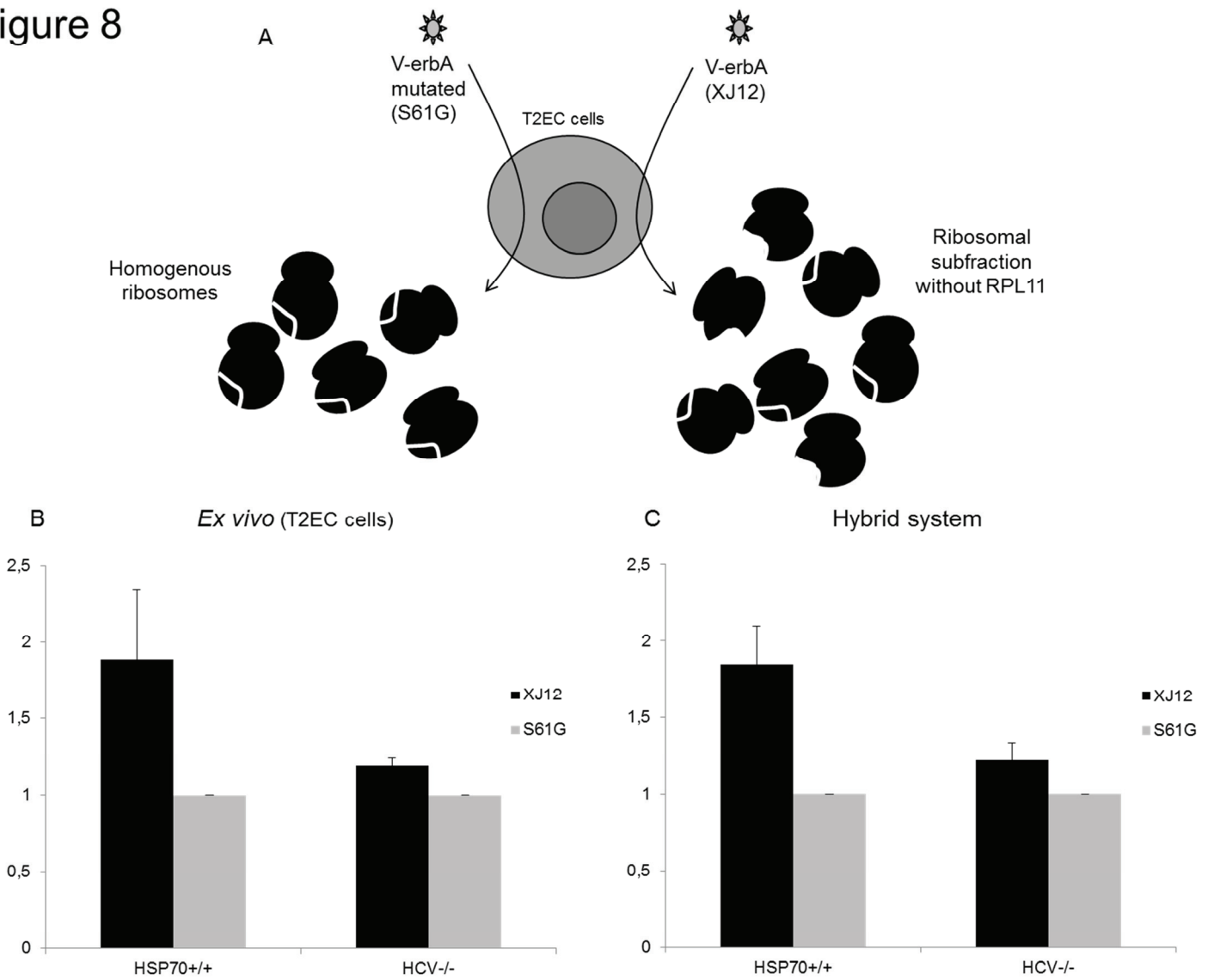


Figure 8



## REFERENCES

- Balvay L, Lastra ML, Sargueil B, Darlix JL, Ohlmann T (2007) Translational control of retroviruses. *Nat Rev Microbiol* **5**(2): 128-140
- Balvay L, Rifo RS, Ricci EP, Decimo D, Ohlmann T (2009) Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim Biophys Acta*
- Bedard KM, Daijogo S, Semler BL (2007) A nucleo-cytoplasmic SR protein functions in viral IRES-mediated translation initiation. *EMBO J* **26**(2): 459-467
- Beilharz TH, Humphreys DT, Preiss T (2010) miRNA Effects on mRNA closed-loop formation during translation initiation. *Prog Mol Subcell Biol* **50**: 99-112
- Benchabib M, Mallet F, Thoraval P, Savatier P, Xiao JH, Verdier G, Samarut J, Nigon V (1989) Avian retroviral vectors derived from avian defective leukemia virus: role of the translational context of the inserted gene on efficiency of the vectors. *Virology* **169**(1): 15-26
- Bergamini G, Preiss T, Hentze MW (2000) Picornavirus IRESes and the poly(A) tail jointly promote cap- independent translation in a mammalian cell-free system. *Rna* **6**(12): 1781-1790.
- Boeras I, Sakalian M, West JT (2012) Translation of MMTV Gag requires nuclear events involving splicing motifs in addition to the viral Rem protein and RmRE. *Retrovirology* **9**: 8
- Borman AM, Bailly JL, Kean KM (1995) Picornavirus internal ribosome entry segments: comparison of translation efficiency and the requirements for optimal internal initiation of translation in vitro. *Nucleic Acids Res* **25**: 925-932
- Borman AM, Le Mercier P, Girard M, Kean KM (1997) Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. *Nucleic Acids Res* **25**(5): 925-932
- Borman AM, Michel YM, Kean KM (2000) Biochemical characterisation of cap-poly(A) synergy in rabbit reticulocyte lysates: the eIF4G-PABP interaction increases the functional affinity of eIF4E for the capped mRNA 5'-end. *Nucleic Acids Res* **28**(21): 4068-4075
- Carlson ED, Gan R, Hodgman CE, Jewett MC (2012) Cell-free protein synthesis: applications come of age. *Biotechnol Adv* **30**(5): 1185-1194

de Breyne S, Soto-Rifo R, Lopez-Lastra M, Ohlmann T (2012) Translation initiation is driven by different mechanisms on the HIV-1 and HIV-2 genomic RNAs. *Virus Res*

Devaney MA, Vakharia VN, Lloyd RE, Ehrenfeld E, Grubman MJ (1988) Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the cap-binding protein complex. *J Virol* **62**(11): 4407-4409

Evans JR, Mitchell SA, Spriggs KA, Ostrowski J, Bomsztyk K, Ostarek D, Willis AE (2003) Members of the poly (rC) binding protein family stimulate the activity of the c-myc internal ribosome entry segment in vitro and in vivo. *Oncogene* **22**(39): 8012-8020

Gandrillon O, Jurdic P, Benchaibi M, Xiao JH, Ghysdael J, Samarut J (1987) Expression of the v-erbA oncogene in chicken embryo fibroblasts stimulates their proliferation in vitro and enhances tumor growth in vivo. *Cell* **49**(5): 687-697

Gandrillon O, Schmidt U, Beug H, Samarut J (1999) TGF-beta cooperates with TGF-alpha to induce the self-renewal of normal erythrocytic progenitors: evidence for an autocrine mechanism. *EMBO J* **18**(10): 2764-2781

Garrey JL, Lee YY, Au HH, Bushell M, Jan E (2010) Host and viral translational mechanisms during cricket paralysis virus infection. *J Virol* **84**(2): 1124-1138

Goshima N, Kawamura Y, Fukumoto A, Miura A, Honma R, Satoh R, Wakamatsu A, Yamamoto J, Kimura K, Nishikawa T, Andoh T, Iida Y, Ishikawa K, Ito E, Kagawa N, Kaminaga C, Kanehori K, Kawakami B, Kenmochi K, Kimura R, Kobayashi M, Kuroita T, Kuwayama H, Maruyama Y, Matsuo K, Minami K, Mitsubori M, Mori M, Morishita R, Murase A, Nishikawa A, Nishikawa S, Okamoto T, Sakagami N, Sakamoto Y, Sasaki Y, Seki T, Sono S, Sugiyama A, Sumiya T, Takayama T, Takayama Y, Takeda H, Togashi T, Yahata K, Yamada H, Yanagisawa Y, Endo Y, Imamoto F, Kisu Y, Tanaka S, Isogai T, Imai J, Watanabe S, Nomura N (2008) Human protein factory for converting the transcriptome into an in vitro-expressed proteome. *Nat Methods* **5**(12): 1011-1017

Hambidge SJ, Sarnow P (1992) Translational enhancement of the poliovirus 5' noncoding region mediated by virus-encoded polypeptide 2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(21): 10272-10276

Herbreteau CH, Weill L, Decimo D, Prevot D, Darlix JL, Sargueil B, Ohlmann T (2005) HIV-2 genomic RNA contains a novel type of IRES located downstream of its initiation codon. *Nat Struct Mol Biol* **12**(11): 1001-1007

Huang Y, Steitz JA (2005) SRprises along a messenger's journey. *Mol Cell* **17**(5): 613-615

Hunt T, Jackson RJ (1974) The rabbit reticulocyte lysate as a system for studying mRNA. *Hamatol Bluttransfus* **14**: 300-307



Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(2): 113-127

Kanter G, Yang J, Voloshin A, Levy S, Swartz JR, Levy R (2007) Cell-free production of scFv fusion proteins: an efficient approach for personalized lymphoma vaccines. *Blood* **109**(8): 3393-3399

Kondrashov N, Pusic A, Stumpf CR, Shimizu K, Hsieh AC, Xue S, Ishijima J, Shiroishi T, Barna M (2011) Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell* **145**(3): 383-397

Krausslich HG, Nicklin MJ, Toyoda H, Etchison D, Wimmer E (1987) Poliovirus proteinase 2A induces cleavage of eucaryotic initiation factor 4F polypeptide p220. *J Virol* **61**(9): 2711-2718

Kubo Y (1991) Comparison of initial stages of muscle differentiation in rat and mouse myoblastic and mouse mesodermal stem cell lines. *J Physiol* **442**: 743-759

Lemay JF, Lemieux C, St-Andre O, Bachand F (2010) Crossing the borders: poly(A)-binding proteins working on both sides of the fence. *RNA Biol* **7**(3): 291-295

Ma XM, Blenis J (2009) Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(5): 307-318

Maquat LE, Tarn WY, Isken O (2010) The pioneer round of translation: features and functions. *Cell* **142**(3): 368-374

Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai RS, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N (2007) MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* **317**(5845): 1764-1767

Michel YM, Poncet D, Piron M, Kean KM, Borman AM (2000) Cap-Poly(A) synergy in mammalian cell-free extracts. Investigation of the requirements for poly(A)-mediated stimulation of translation initiation. *J Biol Chem* **275**(41): 32268-32276

Miura P, Thompson J, Chakkalakal JV, Holcik M, Jasmin BJ (2005) The utrophin A 5'-untranslated region confers internal ribosome entry site-mediated translational control during regeneration of skeletal muscle fibers. *J Biol Chem* **280**(38): 32997-33005

Moore MJ (2005) From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* **309**(5740): 1514-1518

Munroe D, Jacobson A (1990) mRNA poly(A) tail, a 3' enhancer of translational initiation. *Mol Cell Biol* **10**(7): 3441-3455

Nguyen-Lefebvre AT, Leprun G, Morin V, Vinuelas J, Coute Y, Madjar JJ, Gandrillon O, Gonin-Giraud S (2013) V-erbA generates ribosomes devoid of RPL11 and regulates translational activity in avian erythroid progenitors. *Oncogene*

Nirenberg MW, Matthaei JH (1961) The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **47**: 1588-1602

Ohlmann T, Jackson RJ (1999) The properties of chimeric picornavirus IRESes show that discrimination between internal translation initiation sites is influenced by the identity of the IRES and not just the context of the AUG codon. *RNA* **5**(6): 764-778

Ohlmann T, Pain VM, Wood W, Rau M, Morley SJ (1997) The proteolytic cleavage of eukaryotic initiation factor (eIF) 4G is prevented by eIF4E binding protein (PHAS-I; 4E-BP1) in the reticulocyte lysate. *EMBO J* **16**(4): 844-855

Ohlmann T, Prevot D, Decimo D, Roux F, Garin J, Morley SJ, Darlix JL (2002) In vitro cleavage of eIF4GI but not eIF4GII by HIV-1 protease and its effects on translation in the rabbit reticulocyte lysate system. *J Mol Biol* **318**(1): 9-20

Ohlmann T, Rau M, Morley SJ, Pain VM (1995) Proteolytic cleavage of initiation factor eIF-4 gamma in the reticulocyte lysate inhibits translation of capped mRNAs but enhances that of uncapped mRNAs. *Nucleic Acids Res* **23**(3): 334-340

Pelham HR, Jackson RJ (1976) An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem* **67**(1): 247-256

Pestova TV, Hellen CU (2003) Translation elongation after assembly of ribosomes on the Cricket paralysis virus internal ribosomal entry site without initiation factors or initiator tRNA. *Genes Dev* **17**(2): 181-186

Pluckthun A (2012) Ribosome display: a perspective. *Methods Mol Biol* **805**: 3-28

Preiss T, Hentze MW (1998) Dual function of the messenger RNA cap structure in poly(A)-tail-promoted translation in yeast. *Nature* **392**(6675): 516-520

Rau M, Ohlmann T, Pain VM, Morley SJ (1998) A fractionated reticulocyte lysate system for studies on protein synthesis initiation factors. *Methods Mol Biol* **77**: 211-226

Ricci EP, Limousin T, Soto-Rifo R, Allison R, Poyry T, Decimo D, Jackson RJ, Ohlmann T (2011) Activation of a microRNA response in trans reveals a new role for poly(A) in translational repression. *Nucleic Acids Res* **39**(12): 5215-5231

Sanford JR, Gray NK, Beckmann K, Caceres JF (2004) A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation. *Genes Dev* **18**(7): 755-768

Sharif M, Privalsky ML (1991) v-erbA oncogene function in neoplasia correlates with its ability to repress retinoic acid receptor action. *Cell* **66**(5): 885-893

Soto Rifo R, Ricci EP, Décimo D, Moncorgé O, Ohlmann T (2007) Back to basics: the untreated rabbit reticulocyte lysate as a competitive system to recapitulate cap/poly(A) synergy and the selective advantage of IRES-driven translation. *Nucleic Acids Res* **35**(18): e121

Soto-Rifo R, Rubilar PS, Limousin T, de Breyne S, Decimo D, Ohlmann T (2012) DEAD-box protein DDX3 associates with eIF4F to promote translation of selected mRNAs. *EMBO J* **31**(18): 3745-3756

Stoneley M, Chappell SA, Jopling CL, Dickens M, MacFarlane M, Willis AE (2000a) c-Myc protein synthesis is initiated from the internal ribosome entry segment during apoptosis. *Mol Cell Biol* **20**(4): 1162-1169

Stoneley M, Subkhankulova T, Le Quesne JP, Coldwell MJ, Jopling CL, Belsham GJ, Willis AE (2000b) Analysis of the c-myc IRES; a potential role for cell-type specific trans-acting factors and the nuclear compartment. *Nucleic Acids Res* **28**(3): 687-694

Stoneley M, Willis AE (2004) Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene* **23**(18): 3200-3207

Svitkin YV, Sonenberg N (2004) An efficient system for cap- and poly(A)-dependent translation in vitro. *Methods Mol Biol* **257**: 155-170

Thoma C, Ostareck-Lederer A, Hentze MW (2004) A poly(A) tail-responsive in vitro system for cap- or IRES-driven translation from HeLa cells. *Methods Mol Biol* **257**: 171-180

Thoreen CC, Chantranupong L, Keys HR, Wang T, Gray NS, Sabatini DM (2012) A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* **485**(7396): 109-113

Tomek W, Wollenhaupt K (2012) The "closed loop model" in controlling mRNA translation during development. *Anim Reprod Sci* **134**(1-2): 2-8

Wilson JE, Pestova TV, Hellen CU, Sarnow P (2000) Initiation of protein synthesis from the A site of the ribosome. *Cell* **102**(4): 511-520

Witherell G (2001) In vitro translation using HeLa extract. *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 11**: Unit 11 18

Woolaway KE, Lazaridis K, Belsham GJ, Carter MJ, Roberts LO (2001) The 5' untranslated region of Rhopalosiphum padi virus contains an internal ribosome entry site which functions efficiently in mammalian, plant, and insect translation systems. *J Virol* **75**(21): 10244-10249

Xue S, Barna M (2012) Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**(6): 355-369

Yang J, Kanter G, Voloshin A, Levy R, Swartz JR (2004) Expression of active murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in an Escherichia coli cell-free system. *Biotechnol Prog* **20**(6): 1689-1696

Yang J, Kanter G, Voloshin A, Michel-Reydellet N, Velkeen H, Levy R, Swartz JR (2005) Rapid expression of vaccine proteins for B-cell lymphoma in a cell-free system. *Biotechnol Bioeng* **89**(5): 503-511

Zawada JF, Yin G, Steiner AR, Yang J, Naresh A, Roy SM, Gold DS, Heinsohn HG, Murray CJ (2011) Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production--a new approach for shortening protein production development timelines. *Biotechnol Bioeng* **108**(7): 1570-1578

Ziegler E, Borman AM, Deliat FG, Liebig HD, Jugovic D, Kean KM, Skern T, Kuechler E (1995a) Picornavirus 2A proteinase-mediated stimulation of internal initiation of translation is dependent on enzymatic activity and the cleavage products of cellular proteins. *Virology* **213**(2): 549-557

Ziegler E, Borman AM, Kirchweiger R, Skern T, Kean KM (1995b) Foot-and-mouth disease virus Lb proteinase can stimulate rhinovirus and enterovirus IRES-driven translation and cleave several proteins of cellular and viral origin. *J Virol* **69**(6): 3465-3474

## 2. Article 2

### **La protéine NS1 de l'Influenza A est un *trans*-activateur global de la traduction**

Les études du détournement de la traduction lors de l'infection par l'Influenza A suggèrent que l'expression des gènes viraux puisse être favorisée par rapport aux gènes cellulaires. De fait, nous avons voulu étudier le rôle de la structure et composition des régions 5'UTR virales dans ce mécanisme ainsi que le rôle de la protéine virale NS1.

Les résultats obtenus en étudiant l'impact des 5'UTR virales nous ont permis de conclure qu'elles ne conféraient pas un avantage sélectif au niveau de la régulation traductionnelle. Ainsi, des expériences de transfection d'ADN et d'ARN en condition d'infection nous ont permis de mettre en évidence deux événements majeurs qui régulaient l'expression génique. Une série d'événements nucléaires tend à inhiber l'expression des gènes cellulaires ainsi que celle de gènes ectopiques transfectés sous forme d'ADN plasmidique. En revanche nous avons observé que ces mêmes gènes transfectés dans le cytoplasme et sous forme d'ARN étaient stimulés au niveau de leur synthèse protéique. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une protéine virale cytoplasmique pouvait être responsable de cet effet.

Nous nous sommes alors orientés sur la protéine virale NS1 qui avait déjà été impliquées dans le contrôle traductionnel. En utilisant un répertoire de gènes rapporteurs d'origine cellulaire et virale, nous avons confirmé que cette dernière pouvait stimuler fortement la production protéique. En réalisant divers mutants de délétions et mutants ponctuels, nous avons délimité la partie amino-terminale de NS1 comme étant le domaine effecteur. Cet effet a été observé chez tous les gènes rapporteurs étudiés à l'exception de l'IRES du CrPV qui peut initier en absence de facteurs d'initiation pour stimuler la traduction.

# **The NS1 protein from Influenza A acts as a general enhancer of viral and cellular translation**

Baptiste Panthu<sup>1,2,3,4,5</sup>, Coralie Carron<sup>6</sup>, Didier Decimo<sup>1,2,3,4,5</sup>, Laurent Balvay<sup>1,2,3,4,5</sup>, Manuel Rosa-Calatrava<sup>6</sup> and Théophile Ohlmann<sup>1,2,3,4,5\*</sup>

1 CIRI, International Center for Infectiology Research, Université de Lyon, Lyon, France.

2 Inserm, U1111, Lyon, France.

3 Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France.

4 Université Lyon 1, Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon, France.

5 CNRS, UMR5308, Lyon, France.

6 Equipe VirCell, Laboratoire de Virologie et Pathologie Humaine, VirPath EMR 4610, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Hospices Civils de Lyon, Faculté de médecine RTH Laennec, France.

\* To whom correspondence should be addressed.

TO: Tel: (33) 472 72 89 53; Fax: (33) 472 72 81 37; Email: [tohlmann@ens-lyon.fr](mailto:tohlmann@ens-lyon.fr)

## Abstract

The nonstructural protein NS1 of Influenza A viruses plays a key role on the global pathway of the host infected cells including the post-transcriptional process. As such, it was shown to be involved both in the control of viral and cellular translation; however the mechanism by which it acts remains rather obscure and controversial. Thus, we have revisited the role of NS1 in translation by using a combination of Influenza infection together with RNA transfection of reporter genes and *in vitro* translational assays.

Our data show that the NS1 protein is able to enhance translation of virtually all tested mRNAs including those from Influenza and other cellular genes whose expression was driven from a wide spectrum of cellular and viral IRESes including picornavirus and hepatitis C. Interestingly, the only RNA that was resistant to NS1 stimulation was that derived from the CrPV genomic RNA. Further investigation into the molecular mechanism revealed that the amino-terminal domain of NS1 contains an RNA binding region that is required for translation stimulation and preliminary data suggest that NS1 may interact directly with the multi subunit initiation factor eIF3.

A model for translation enhancement by the NS1 protein is proposed where the latter can tether to mRNAs to directly bind the 43 S ribosomal subunit.

## Introduction

Influenza virus is a major human pathogen with pandemic outbreaks such as in 1918 that could result in over 20 million deaths worldwide <sup>127,132</sup>. Influenza is an enveloped virus which belongs to the Orthomyxoviridae family and possesses a negative single-stranded RNA genome of 8 distinct segments that code for 11 different proteins: hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA), matrix 1 (M1), matrix 2 (M2), nucleoprotein (NP), non-structural protein 1 (NS1), non-structural protein 2 (NS2 or NEP), polymerase acidic protein (PA), polymerase basic protein 1 (PB1), polymerase basic protein 2 (PB2) and polymerase basic protein 1-F2 (PB1-F2) <sup>183</sup>. The viral life cycle can be divided into several stages: the first step concerns the entry of the viral ribonucleoproteins (RNPs) into the nucleus where it undergoes transcription and replication. Transcription and replication are performed by the three subunits of the polymerase (PB2, PB1 and PA) together with NP <sup>174</sup>. This generates positive strand complementary RNAs (cRNAs) that will serve for the production of vRNAs (and packaged in the genome of newly synthesized virions) and mRNAs that will serve as templates for viral protein production <sup>170</sup>. Interestingly, viral mRNAs (but not vRNAs) harbor a 5' methylated cap that is stolen from cellular transcripts in a process called 'cap-snatching' <sup>217</sup>. This occurs by a subtle subversion of the cellular transcriptional machinery whereby the PB1, PB2 and PA bind to the 5' m7GTP cap of cellular mRNAs and cleave them about 9 to 17 nucleotides downstream to the 5' end. This cellular fragment is then used as a primer for viral transcription <sup>159,160,217</sup>. Such an event is accompanied by degradation of the cleaved cellular transcripts together with impairment of nucleo-cytoplasmic export and causes a shut-off of cellular gene expression <sup>198,239</sup>. The mature viral mRNAs are then exported to the cytoplasm via a CRM1 dependent pathway where they are translated into proteins <sup>178</sup>.



In higher Eukaryotes, the control of protein synthesis is critical with misregulation of this process causing drastic consequences that leads to impairment of cell viability and renewal. The control of protein synthesis is mainly exerted at the level of translation initiation. For the majority of eukaryotic mRNAs, translation initiation begins by the attachment of the 40 S ribosomal subunit to the 5' capped end of the transcript followed by linear scanning until it reaches an AUG codon <sup>10</sup>. This process is mediated by 11 initiation factors amongst which is found the eIF4F complex which is composed of eIF4E, eIF4A and eIF4G which plays a critical role both in promoting ribosomal entry onto the mRNA molecule and scanning towards the AUG codon <sup>36</sup>. The efficiency of translation initiation is controlled both at the level of the intrinsic structure of the messenger and the concerted action of cellular proteins amongst which are the eukaryotic initiation factors (eIFs). Due to the complexity of eukaryotic translation, all known viruses need to exploit the translational apparatus to produce their proteins. As such, they often develop strategies to ensure the preferential use of ribosomes for their own purpose. This can be done by specifically recruiting some cellular or viral proteins and to exhibit viral RNA sequences that preferentially interact with ribosomes or ribosome associated factors.

Although little is known about Influenza translational control, previous reports have implicated both the structure of the viral 5'UTR and the interplay with the multifunctional NS1 protein to be major determinants for viral protein production. The viral 5'UTR is typically quite short (about 50 nts.) and not particularly structured in terms of secondary and tertiary RNA interactions <sup>208,212</sup>. These Viral UTRs are highly conserved among the different Influenza A strains and are known to contain structural motifs that are essential for replication and viability <sup>208,212</sup>. About this last point, initial studies reported that Influenza 5'UTR would confer translational specificity and selective advantage over the cellular mRNAs serving for a basis to explain that viral protein production was so efficient<sup>237,249</sup>. However, this point of

view has been challenged by Cassetti and colleagues and further work is needed to understand how viral production proceeds in infected cells <sup>250</sup>. Several reports have also implicated the NS1 protein in this mechanism. Indeed, NS1 is an RNA-binding protein that performs multiple accessory functions during viral infection. As such, it is involved in the host immune response, in mRNA processing, nuclear export but also in the control of both viral and cellular translation (see for review <sup>189</sup>). For instance, NS1 can block the activation of the dsRNA-activated protein kinase R (PKR) to prevent it to shut down host cell translation <sup>233</sup>. In addition, NS1 has also been shown to bind with many different cellular proteins, some of them being involved in the control of translation such as the poly(A) binding protein (PABP1), the initiation factor eIF4G1 and Staufen <sup>231,232,261,261</sup>.

In this manuscript, we have re-assessed the impact of the 5'UTR of the 8 viral Influenza fragments and the role of NS1 on viral and cellular translation. By using a combination of viral infection, *ex-vivo* and *in vitro* functional assays, we could demonstrate that none of the Influenza RNA segments exhibit structures that enhance translation. However, investigations on the role of NS1 show that the latter is a general enhancer of translation. In fact, NS1 has the ability to stimulate protein synthesis driven by capped, uncapped and IRES-driven mRNAs with the sole exception of the CrPV IRES. This mechanism requires the amino-terminus part of NS1 and more particularly positively charged residues that are involved in RNA binding.

## Results

### *Influenza infection stimulates cytoplasmic gene expression*

As a first approach for the study of Influenza translation, we have cloned all the 8 derived viral 5'UTRs upstream of a luciferase reporter gene. These were then transcribed *in vitro* to

obtain capped and polyadenylated transcripts that were transfected into an epithelial lung cell line (A549) or rabbit reticulocyte cell lysate (RRL). After 3 hours, luciferase activity was determined and the results are presented in Fig. 1A and 1B. It can be seen that all viral 5'UTRs were able to drive translation quite efficiently and we only could detect minor differences in protein production with the PB1 5'UTR that was less efficient than the others. Interestingly the pattern of expression between cells and the RRL appears to be globally the same and does not reveal any evidence for a particular translational enhancement due to the presence of the viral 5'UTRs thus not in agreement with the work of Garfinkel and colleagues

249

We next went on to investigate the ability of these 5'UTRs to translate in the context of viral infection. The A549 cells were first transfected with plasmid cDNA coding for globin-renilla or NP-renilla for 24 h before infection with the PR8 viral strain and protein production was analyzed 8 hours post infection. Under this experimental setting, we observe quite a significant decrease of luciferase production from cDNA expression for reporter genes driven by NP and globin 5'UTRs. (Fig 1 C). However, this could be expected as Influenza infection is known to affect several steps of nuclear gene regulation including transcription and viral export. Therefore, in order to focus on cytoplasmic gene expression, we decided to use RNA transfection in PR8 infected cells to by-pass any regulation of gene expression upstream from translation. Interestingly, in this experimental setting luciferase production driven by NP and globin 5'UTR was enhanced by about 2-fold by the ongoing Influenza infection (Fig. 1D) suggesting that protein synthesis could be stimulated by one, or several, viral proteins.

In order to further investigate this, we next used the RRL which was supplemented with an S10 cellular extract made from A549 infected cells with PR8. *In vitro* transcribed RNAs containing the globin or the Cricket Paralysis Virus (CrPV) 5'UTR driving the renilla reporter

gene were then translated for 30 minutes and protein synthesis was measured and plotted in Fig. 1E. Data show that globin-driven translation was enhanced by the addition of S10 and this confirms data obtained above. However, we were surprised to observe that translation driven by the CrPV IRES remained unaffected by the addition of S10; this suggests that stimulation could occur at the level of initiation and would probably involve a functional interaction with one, or several, initiation factors.

### **NS1 stimulates translation both *in vitro* and *ex-vivo***

It has been reported that Influenza infection results in the overall decrease of cellular gene expression<sup>252</sup> and data presented above using cDNA transfection (Fig. 1C) are in agreement with this statement. However, as far as translation is concerned, it appears that Influenza infection would stimulate, rather than inhibit, cytoplasmic gene expression (Fig. 1D and 1E). Previous published work has implicated the NS1 protein as a potential enhancer of translation although its exact role in this mechanism has been the matter of debate. Thus, we have decided to revisit the role of NS1 in translation by taking an RNA transfection approach in A549 together with *in vitro* translation assays in the RRL in order to eliminate any nuclear events that could bias interpretation of the data. A cartoon depicts the experimental procedure that was used (Fig. 2A). Gene expression driven by 5'UTR derived from cellular (globin and GAPDH) and viral (NP) genes were used and translation was measured in both A549 cell line and the RRL (Fig. 2B). The results show that translation of all reporter genes were stimulated by the addition of NS1, but not the GFP control, to about the same level both in *ex-vivo* and *in vitro* assays. *In vitro*, this stimulation was observed over a wide range of RNA concentration (Fig. 2C) and occurs about 20 minutes after the beginning of the incubation period (Fig. 2D). Then a cytoplasmic RNA extraction from infected cell was used to be translated in RRL in the presence of NS1 or GFP. This shows that viral protein synthesis is also stimulated by NS1

(Fig. 2E). Finally, we have estimated the amount of NS protein required for translation stimulation in the RRL. This was done by measuring the intensity of NS produced taking account of the total number of methionine residues and the calculation gave a concentration range between 60 to 160 femtomol of NS protein per 10 $\mu$ l of final reaction mix.

Taken together, these data show that the NS1 protein has the ability to stimulate translation driven by cellular and viral 5'UTRs both *ex-vivo* and *in vitro*.

### ***The amino terminal part of NS1 is required for translation stimulation***

Having established a stimulatory role for NS1 on translation, we next wanted to delineate which domains of the protein could be involved in this effect. A first series of deletions and point mutations were introduced in the coding region of the vector coding for NS1 (Fig. 3A). These mutants were translated in the RRL in order to synthesize the corresponding polypeptides and visualized by incorporation of [<sup>35</sup>S]Met into protein (Fig. 3B); all of them were efficiently generated as a single gene product and at the correct size. The effect of these truncated NS proteins was then assessed on *in vitro* translation of a renilla luciferase construct in the untreated rabbit reticulocyte lysate. The use of this *in vitro* system allows to evaluate the effects of NS1 addition on translation of both ectopically added (luciferase) and endogenous mRNAs (globin and lipoxxygenase). From these data (Fig. 3C), it can clearly be seen that only the amino terminal part of NS1 (1-81) retained the ability to stimulate translation of all mRNAs expressed in the RRL; surprisingly, the 112-230 segment of NS1 was of no effect on protein synthesis although it contains the binding site for eIF4G (Fig. 3D). Interestingly, the amino-terminal segment contains both the binding site for PABP and a general RNA binding domain <sup>225,261</sup>. Given the nature and composition of this segment in positively charged amino acids (mainly R and K), we decided to mutate some of them and to look at its effect on translation. Out of these modifications, we found that changing R38A and

K41A (mutant RKAA) abrogated the effect of NS1 both in the context of the full length protein (NS1 RKAA) and in the truncated amino terminal part (1-81 RKAA). Interestingly, these point mutations have been previously reported to abrogate RNA binding<sup>237</sup>. Therefore, this suggests that NS1 could exert its stimulatory effect on translation by binding to the RNA. Next, we wanted to delineate more precisely which segment of the amino terminal part of NS1 was involved in translation stimulation. Thus, we based our approach on a bioinformatics analysis from the amino terminus part of NS1 (Fig. 3D). This has highlighted sub-domains that correspond to 3 conserved helices as indicated on the figure. We have introduced a series of further nested deletions (Fig. 3 E; aa 1 to 50; aa 20 to 73 and aa 30-43) and we have used them alone or in combination to monitor the effects on luciferase translation in the RRL (Figure 3F). It is noteworthy that none of the truncated segments was able to stimulate translation of the reporter gene suggesting that all 3 helices are required for NS1 mediated stimulation of translation.

### ***NS1 does not stimulate translation driven by the CrPV IRES***

Having determined the involvement of the Nt domain of NS1, the next step was to investigate whether this stimulation was specific to a subset of mRNAs. To determine this, *in vitro* translated full length NS1 or NS1 truncations (Fig. 4A) were added to the RRL programmed with the globin-renilla luciferase reporter gene (Fig. 4B), a dual firefly/renilla luciferase bicistronic mRNA containing the EMCV IRES in the intercistronic spacer (Fig. 4C), or constructs driven by the HCV and CrPV IRESes (Fig. 4D). Addition of the full length NS1, or the N-terminal part of it, resulted in translation stimulation of globin mRNAs independently from their cap and poly(A) status (Fig. 4B). The same proteins also enhanced both cistrons of the bicistronic construct and with a similar order of magnitude (Fig. 4C). Assessment of translation driven by the HCV IRES also showed stimulation but to a level above that obtained with other RNAs tested (Fig. 4D, 8-fold stimulation compared to about 2-fold for globin and EMCV). It is noteworthy that for most transcripts (with the exception of HCV), stimulation was also greater with the truncated amino-terminus fragment rather than with the full length protein. In sharp contrast, protein synthesis driven by the CrPV IRES was not affected by addition of the full length, or truncated NS protein. This was further shown by using the R38A K41A mutated version of NS1 that was of no effect on CrPV IRES translation. This is in agreement with data obtained in Fig. 1E showing that addition of a S10 derived from Influenza infected cells did not influence CrPV translation.

Taken together these data suggest that NS1 can stimulate translation of capped, uncapped, polyadenylated, non polyadenylated and IRES containing mRNAs with the sole exception of the CrPV. Given the unique mode of translation used by the latter, it suggests that stimulation may be mediated by eIF2 or eIF3 (see discussion).

## Discussion

Our initial aim was to characterize the *cis*- and *trans*- acting elements that are involved in the control of Influenza translation. For this, we first investigated whether any of the 8 viral 5'UTRs could contain RNA motifs that could serve as translational enhancers (Fig. 1); this was not the case. We then used reporter RNA transfection coupled with Influenza infection or the addition of infected extracts to the RRL (Fig.1) to show that one, or several, viral proteins exerted a stimulatory effect on translation. A likely candidate was the non-structural protein NS1 which is a multifunctional scaffold polypeptide interacting with many different cellular actors including eIF4G, PAPB and hStaufen that are all linked with translation<sup>231,232,261</sup>. By using *ex-vivo* and *in vitro* functional translation assays, we could show that NS1 was able to stimulate translation of both viral (derived from Influenza) and cellular mRNAs (Fig. 2). Further investigation determined that the 1-81 first amino acids of the protein were needed for such an effect (Fig. 3). As this region corresponds to a previously reported RNA binding domain, we have introduced point mutations targeting positively charged residues such as arginine and lysine that are located at positions 38 and 41 to show that these were essential for NS1 mediated stimulation (Fig. 3). Of note, deletion of the eIF4GI interacting domain did not abrogate the ability of NS1 to enhance translation (Fig. 3) suggesting that it does not require any interaction with the latter. Finally, by using a spectrum of various reporter genes including cap-dependent and IRES-driven ones, we further showed that NS1 was influencing translation of all of them but the one derived from the CrPV IRES (Fig. 4). Interestingly, NS1 was able to stimulate translation from non polyadenylated transcripts such as globin -/- and HCV -/- which strongly suggests that the NS1-PABPI interaction would not be primarily involved for stimulation. Similarly, the ability of NS1 to stimulate HCV translation indicates that none of the components of the eIF4F complex (eIF4E, eIF4A and eIF4G) are needed for this effect. In addition, stimulation of EMCV IRES and HCV IRES driven transcripts also



indicates that stimulation does not occur during ribosomal scanning as both use little, or no, movement of the 40 S ribosome to reach the AUG codon<sup>319</sup>.

The lack of stimulation of the CrPV IRES, which requires none of the canonical factor for translation, is very informative and could help to decipher the mechanism by which NS1 interferes with translation. This suggests that NS1 would require either eIF2 or eIF3 for stimulation. Given the RNA binding property of NS1, we favor the second hypothesis and we propose a model in which NS1 would interact with the RNA via its amino terminal region. As such it would act as a molecular anchor to recruit the ribosome probably via an NS1-eIF3 interaction. This could help to augment the number of ribosomes to the mRNA or could also play a role in translation re-initiation for which eIF3 has been shown to be an important player<sup>87</sup>. Although very speculative for the moment, we have obtained preliminary data showing a putative RNA independent eIF3/NS1 interaction (data not shown).

In the context of the Influenza viral life cycle, a global stimulation of both viral and cellular translation would make sense as it could probably benefit to the virus by enhancing its protein production. Indeed, it should be remembered that Influenza viral infection induces a rapid shut off of gene expression that is due to subversion of the transcriptional and export machinery<sup>198,239</sup> but also to the degradation of cellular mRNAs by cap-snatching in the nucleus and inhibition of mRNA export and processing. This cascade of nuclear events quickly leads to a decrease of cellular mRNAs present in the cytoplasm of the infected cell. Therefore, a global enhancement of translation at this stage is likely to benefit to viral RNAs.

Last but not least, this is the first time that a viral protein is identified as a general enhancer of both viral and cellular translation. Given that this effect was also observed in cell culture and *in vitro* (Fig. 2), it could be envisioned to use the NS1 protein as a tool to increase protein production in cell free protein synthesis assays or in a cellular context. This would be even

more valuable as the amino terminal part (1-81) alone is sufficient to mediate this effect and could probably be synthesized chemically at low cost.

## **Materials and methods**

### ***DNA constructs***

The globin, GAPDH cellular 5'UTR, the 8 viral 5'UTR of A/Puerto Rico/8/1934(H1N1) HCV and CrPV IRES were obtained by PCR using the p0-glo-renilla, p0-GAPDH-renilla, p0-EMCV-renilla, p0-HCV-renilla, p0-CrPV-renilla (Soto Rifo et al, 2007) respectively or directly order as sense and antisense primer for viral 5'UTR and using specific primers containing PvuII restriction site and T7 promoter and HpaI restriction site (for sense primers) and BamHI restriction site (for antisense primers). PCR products were digested and cloned in p1-renilla and pCDNA3.1-renilla backbone vectors previously digested by PvuII and BamHI or HpaI and BamHI restriction enzymes respectively. Our pCDNA3.1 vector was modified after the CMV promotor to minimize the number of nucleotides added upstream of the 5'UTR. Position of the +1 transcription site was controlled by rapid amplification of cDNA extremity (RACE) (Ambion kit). P1-bicistronic construction was cloned with the combination of the simple digest p0- $\beta$ -globin-firefly vector (AflII restriction site) and EMCV-renilla insert obtained by PCR using the p1-EMCV-renilla.

### ***In vitro transcription***

RNAs were transcribed using the T7 RNA polymerase from templates linearized either at the AflII for Polyadenylated RNAs or at the EcoRV sites for non-polyadenylated RNAs. Uncapped RNAs were obtained by using 1µg of linear DNA template, 20U of T7 RNA polymerase (Promega), 40U of RNasin (promega), 1,6mM of each ribonucleotide triphosphate, 3mM DTT in transcription buffer (40mM Tris-HCl (pH 7,9), 6mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM spermidine and 10mM NaCl). For capped mRNAs, the rGTP concentration was reduced to 0,32mM and 1,28mM of m<sup>7</sup>GpppG cap analogue (New England Biolabs) was added. The transcription reaction was carried out at 37°C for 2h and the mRNAs were precipitated with ammonium acetate at 2,5M final concentration. The RNA pellet was then resuspended in 30µL RNase free water and RNA concentration was determined by absorbance using Nanodrop technology. RNAs integrity was checked by electrophoresis on non-denaturing agarose gel.

### ***Cell culture***

A549 or Hela cells were obtained originally from American Tissue Type Culture Collection and were typically grown in DMEM containing 10% fetal calf serum (FSC) supplemented with 50U/ml of penicillin, 50µg/ml of streptomycin (PS) under a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

### ***Virus amplification and infection***

Influenza A viral strain A/Puerto Rico/8/1934(H1N1) was obtained from the French national Influenza monitoring network GROG (Groupes Régionaux d'Observation de la Grippe, Lyon, France). They were subsequently amplified on MDCK cells (two passages).

MDCK cells were obtained originally from American Tissue Type Culture Collection and were passaged twice weekly in serum free Ultra-MDCK medium (Lonza) supplemented with

2mM L-glutamine (Sigma Aldrich), 225U/ml of penicillin, 225µg/ml of streptomycin (PS) under a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

For infection, virus was inoculated at a multiplicity of infection (MOI) of 6 in DMEM supplemented with 200 units/ml penicillin, 200µg/ml streptomycin, 2mM L-glutamine and 0,5µg/ml TPCK-trypsin (Roche diagnostics). After 2h at 37°C, the inoculum was removed and replaced by fresh medium. Infected cells were then incubated for 8hpi. Infection efficiency was checked by FACS using NP antibody coupled with red fluorophore.

### ***DNA transfection***

A549 cells were transfected with 100ng of interest plasmid DNA for  $1.10^5$  cells using Amaxa Nucleofector Technology with program number 2 as specified by the manufacturer. Cells were infected or mock infected 24h after transfection and lysed 32h after transfection (8hpi) either to determine luciferase activity.

### ***RNA transfection***

A549 or Hela were electroporated with 100ng of *in vitro* synthesized mRNAs (see below) for  $10^5$  cells with the Neon<sup>TM</sup> system (life technology) following supplier's indications or with Amaxa Nucleofector Technology with program number 2 as specified by the manufacturer if they were 7h previously infected or mock infected . Cells were lysed 1h after transfection (corresponding to 8hpi in case of infection) and luciferase activity was determined.

### ***Preparation of URRL and in vitro translation assays***

The method used was identical to that described (Soto Rifo et al, 2007) and can be briefly summarized as follow: 1ml of untreated RRL (URRL) was supplemented with 25µM Hemin (Fluka), 25µg creatine phosphokinase (Sigma Aldrich), 5mg creatine phosphate (Fluka), 50µg of bovine liver tRNAs (Sigma Aldrich) and 3mM of D-glucose (Sigma Aldrich).

*In vitro* transcribed RNAs were translated at 2,7 nM in a final volume of 10µl of lysate supplemented with 75mM KCl, 0,75mM MgCl<sub>2</sub>, 20µM amino acids mix. The translation reaction is left incubated for 30mn at 30°C in nuclease treated RRL or untreated RRL (Promega) before the reaction is stopped by addition of renilla lysis buffer (Promega). When adequate, [<sup>35</sup>S]-methionine labeled radioactive proteins were translated in presence of 20µM of amino acids mix minus methionine and 5µCi of [<sup>35</sup>S]-methionine (Perkin Elmer) for 30 mn before the reaction was stopped by addition of SDS loading buffer.

### ***Western blot and autoradiography***

Samples were resolved on a 12% SDS-PAGE, transferred to PVDF membrane and blotted using anti NS1 (Santa cruz) or dried and subjected to autoradiography for 12h by the use of Kodak Biomax films (Fisher Scientific) and quantified with a Molecular Dynamics PhosphoImager.

### ***Renilla activity***

Renilla activity was measured using the renilla luciferase Assay System (Promega Co, Madison, WI, USA) in a Mithras (Berthold technologies) with 50µl substrate injection and 10 seconds of signal integration program.

## **Acknowledgments**

This work was supported by grants from the ANRS and Baptiste Panthu holds a PhD fellowship from the Région Rhône-Alpes.

## Figure legends

### **Figure 1. *Influenza infection can stimulate cytoplasmic gene expression***

(A) Capped and polyadenylated luciferase reporter RNAs containing 5'UTRs derived from the 8 segments of the PR8 strain of the Influenza A virus (PB2, PB1, Pa, Ha, NP, Na, M and NS) together with  $\beta$ -globin and GAPDH were transfected in A549 cells for 3 hours prior to luciferase quantification. (B) The same RNAs as above were translated in the RRL for 30 minutes. (C) A549 cells were transfected with plasmid cDNAs coding for globin-renilla or NP-renilla for 24 hours prior to infection with mock, or a PR8 strain of Influenza. 8 hours post infection, luciferase activity was determined and plotted. (D) Similar experimental setting as in (C) except that the reporter constructs were transfected in the form of capped and polyadenylated RNAs. (E) Translation of capped/polyadenylated globin-renilla and uncapped/polyadenylated CrPV-renilla RNAs in the RRL that has been supplemented with increasing amounts of S10 extracts derived from Mock or PR8 infected A549 cells. Results are expressed as mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

### **Figure 2. *The NS1 protein can stimulate translation in A549 cells and in the RRL***

(A) Schematic representation of the experimental setting used. (B) A549 cells (left panel) or the RRL (right panel) were co-transfected with globin-renilla, NP-renilla or GAPDH-renilla reporter RNAs in the presence of either NS1, or GFP proteins. (C) Different concentrations (as indicated at the bottom of the graph) of the globin-renilla RNA were translated in the uRRL in the presence of either *in vitro* translated GFP or NS1. (D) Similar experimental setting as in (C) but with variations in the kinetic of the time points taken to monitor luciferase production. (E) 1 $\mu$ g of total RNAs extracted from PR8 infected cells were translated in the RRL in the presence of *in vitro* translated GFP or NS1 proteins. The position

of the viral proteins is indicated on the right handside of the autoradiography. Results are expressed as mean +/- SD of three independent experiments.

**Figure 3. Domains of NS1 involved in translation stimulation**

(A) Schematic diagram summarizing truncations and deletions introduced in the NS1 protein. (B) Translation of the corresponding RNAs in the RRL in the presence of <sup>35</sup>S methionine. Labeling refers to the numbers used above. (C) A capped and polyadenylated globin renilla RNA construct was translated in the uRRL supplemented with either *in vitro* translated GFP or with segments of NS1 described in (A). Position of the lipoxygenase, renilla and β-globin proteins are indicated at the left handside of the figure (D) Diagram showing the interacting domains of NS1 with RNA, PABP and eIF4G. The bottom part represents the amino-acids composition of the Nt (1-81) domain of NS1 and their variations in different strains. (E) Schematic diagram of the nested deletions introduced in the Nt part of NS1. (F) A capped and polyadenylated globin renilla RNA construct was translated in the uRRL supplemented with either *in vitro* translated GFP or with segments of the amino terminal fragments of NS1 described in (E). Results are expressed as mean +/- SD of three independent experiments.

**Figure 4. NS 1 does not stimulate translation driven by the CrPV IRES**

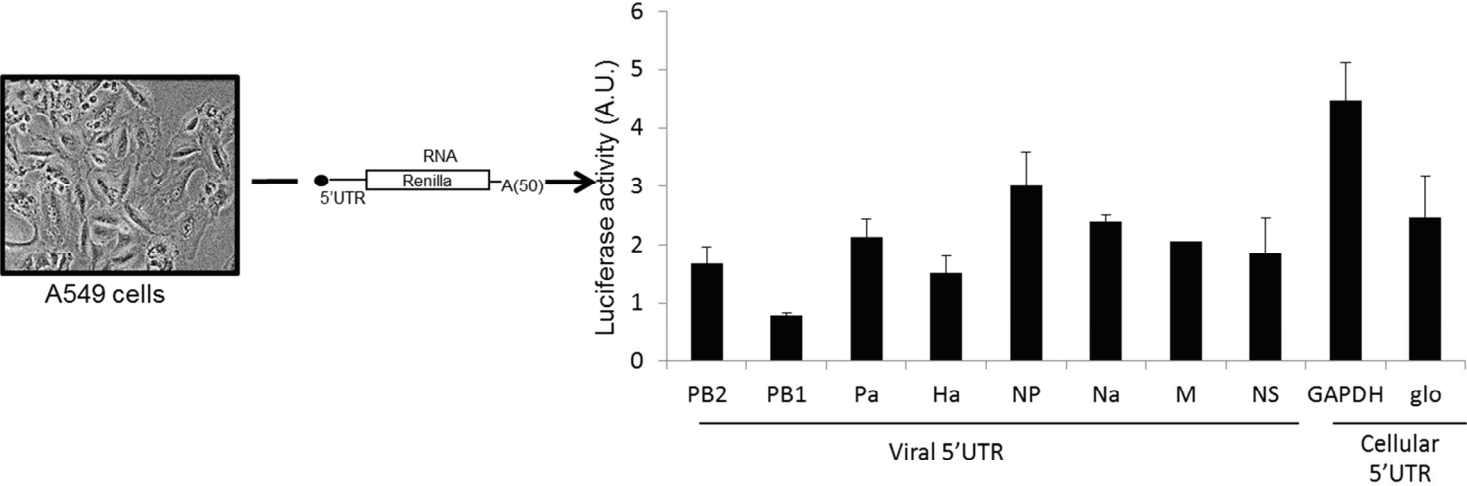
(A) The RNAs coding for the full length NS1 (black), the amino terminus (1-81; dark grey), the carboxy terminus (82-230, light grey) or the GFP protein (beige) were expressed in the RRL to produce the corresponding polypeptides that were visualized by autoradiography. (B) Globin-renilla RNAs bearing, with cap and poly(A) (glo+/+), with cap but without poly(A) (glo+/-), without cap but with a poly(A) (glo-/+) or without both cap and poly(A) (glo-/-) were translated in the RRL in the presence of the *in vitro* translated proteins depicted above (according to the same colour code). For clarity, a blow up picture of the values obtained with

the glo -/- has been inserted. (C) A capped and polyadenylated bicistronic RNA globin-firefly (left panel) and EMCV-renilla (right panel) was translated in the RRL in the presence of the *in vitro* translated proteins depicted above (according to the same colour code) (D) Capped and polyadenylated globin-renilla, uncapped and non polyadenylated HCV-renilla and uncapped and polyadenylated CrPV-renilla RNA constructs were translated in the RRL in the presence of the *in vitro* translated proteins depicted above (according to the same colour code). The bottom table summarizes the use of eIFs for each of these constructs. (E) Capped and polyadenylated globin-renilla and uncapped and polyadenylated CrPV-renilla RNA constructs were translated in the RRL in the presence of the *in vitro* translated NS1, NS1 bearing point mutations in R38 and K41 or GFP proteins as indicated on the figure. Results are expressed as mean +/- SD of three independent experiments.



Figure1:

A



B

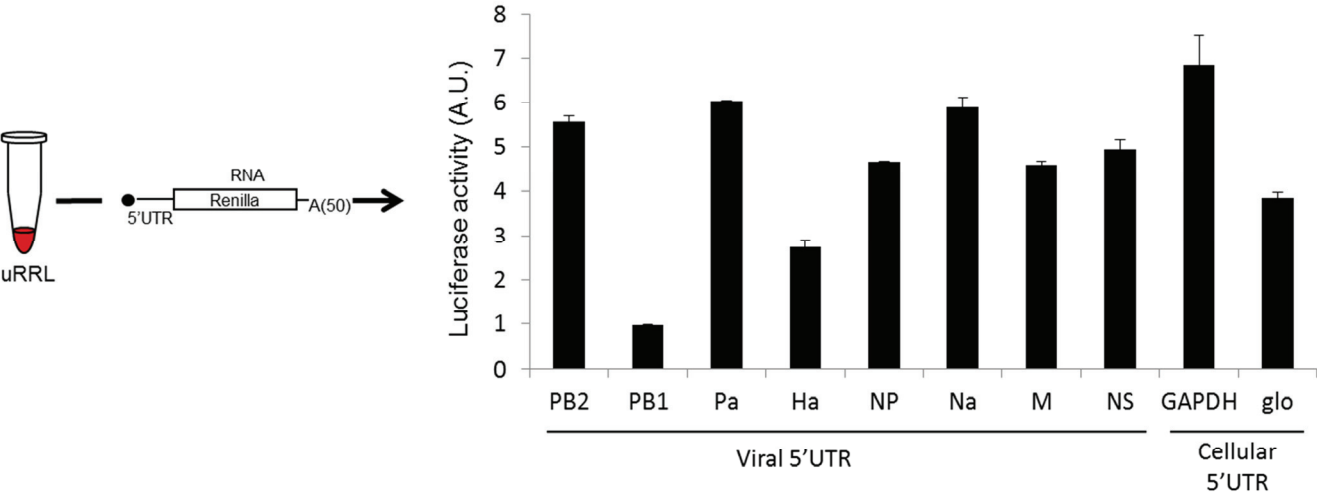


Figure1:

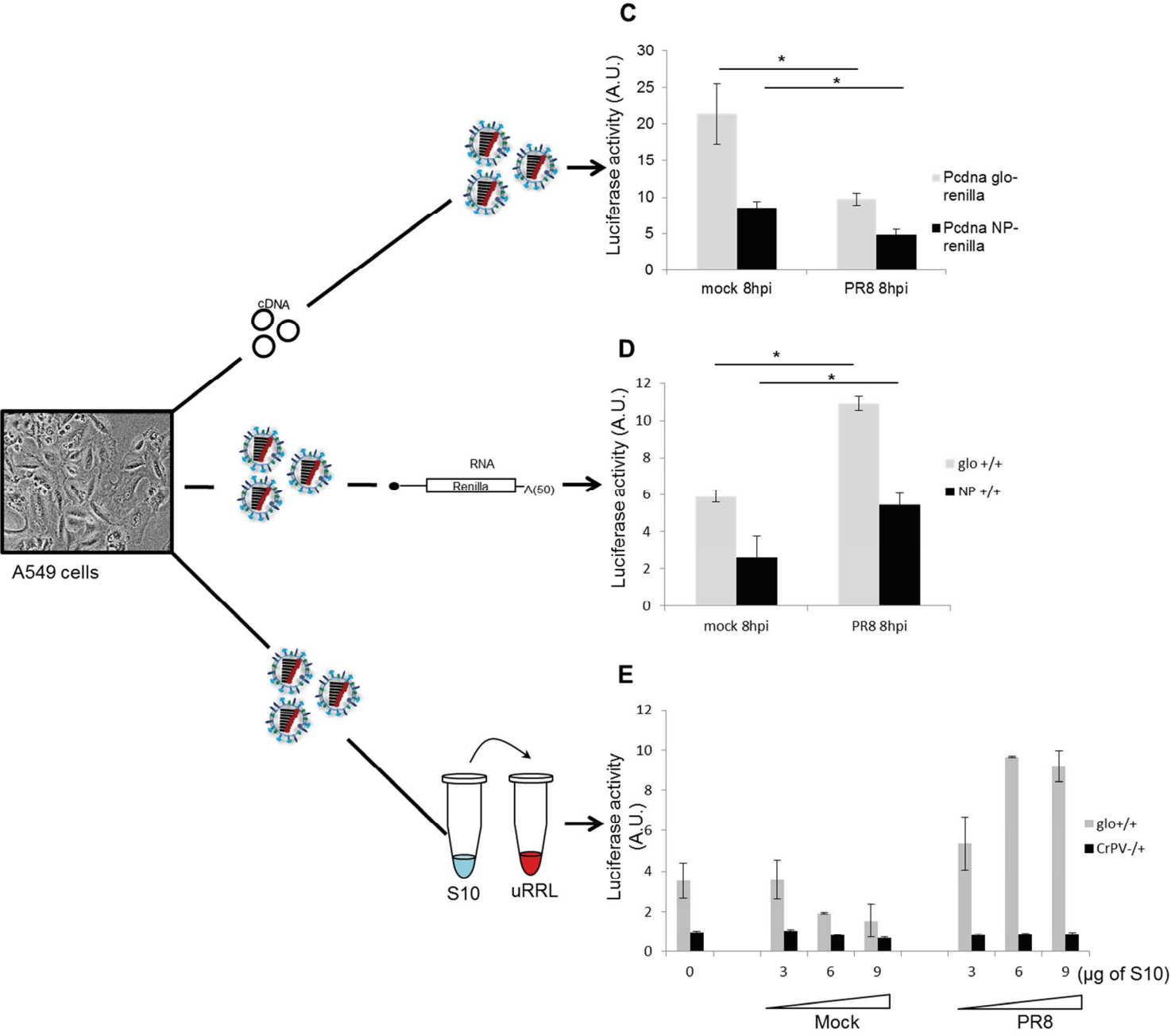


Figure 2

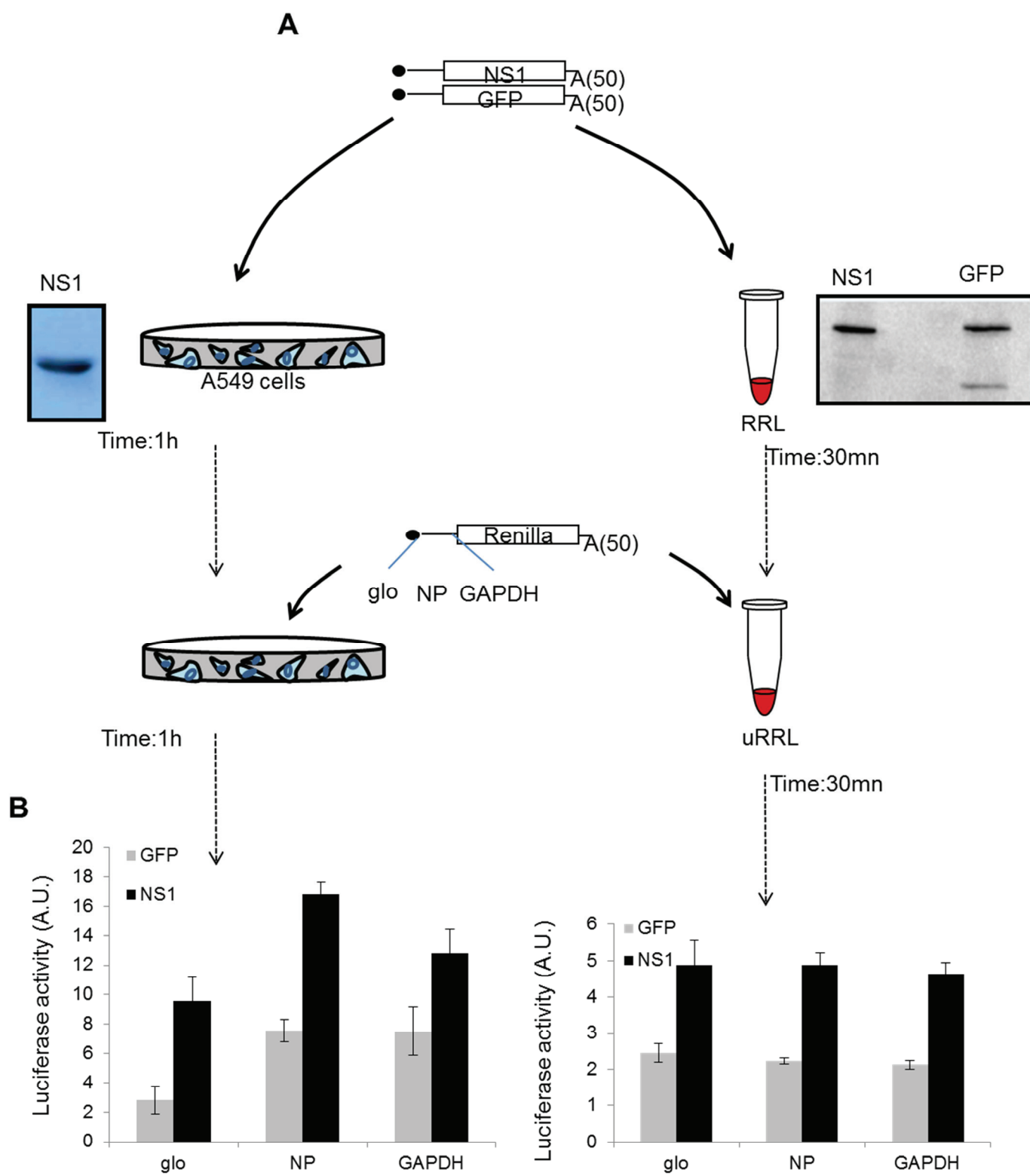
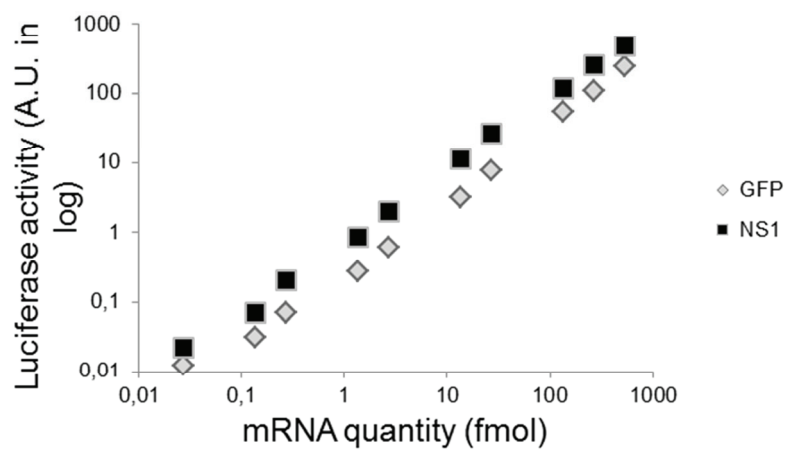
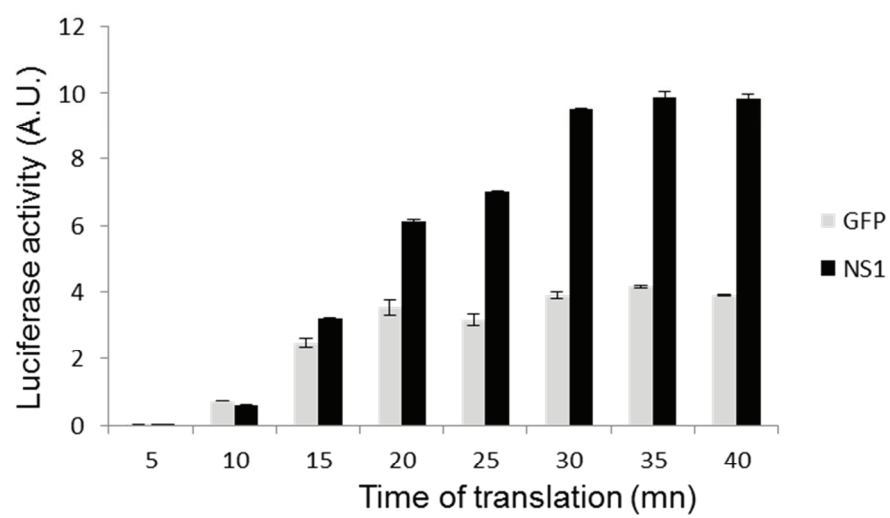


Figure 2

**C**



**D**



**E**

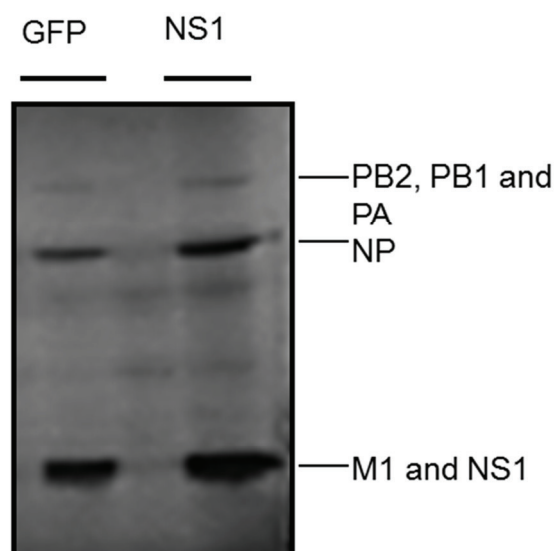
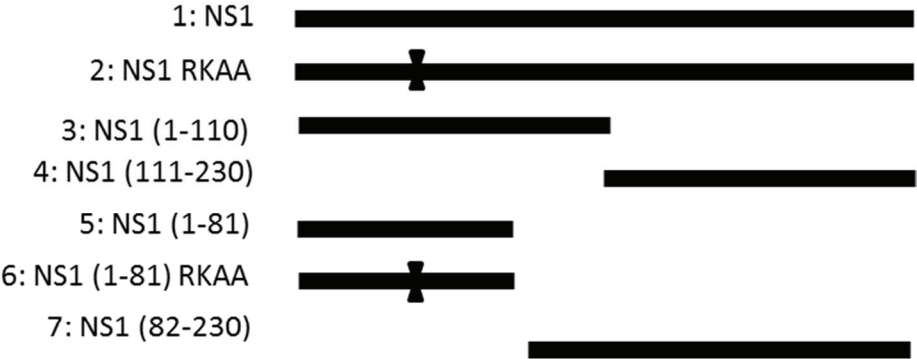
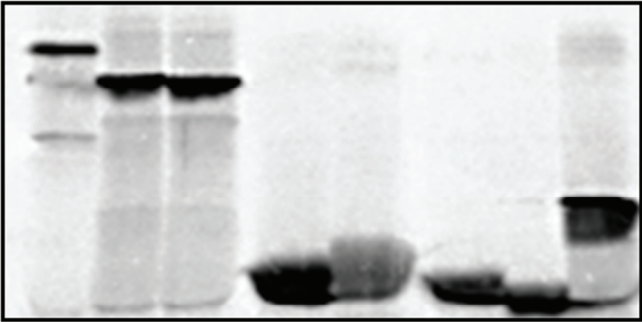


Figure 3

A



B



C

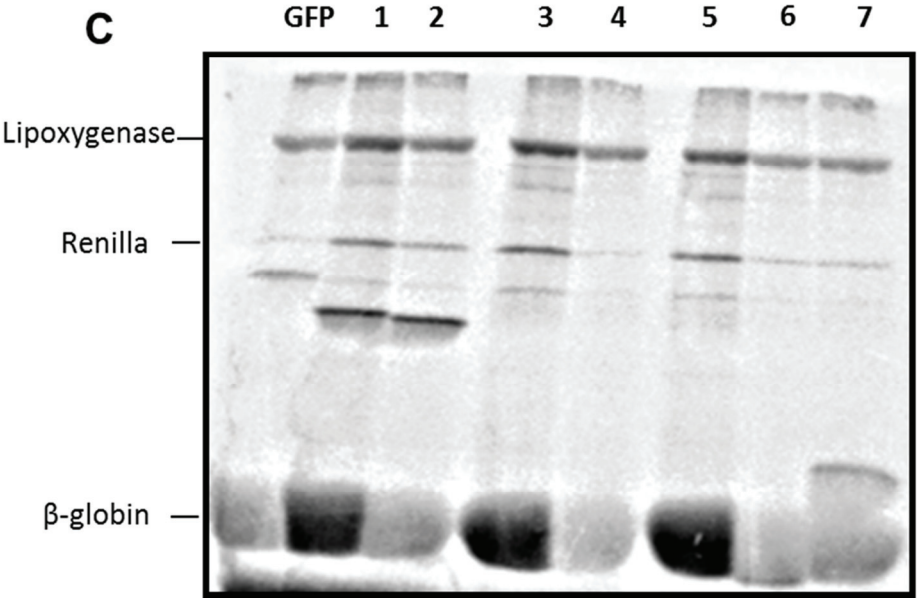


Figure 3

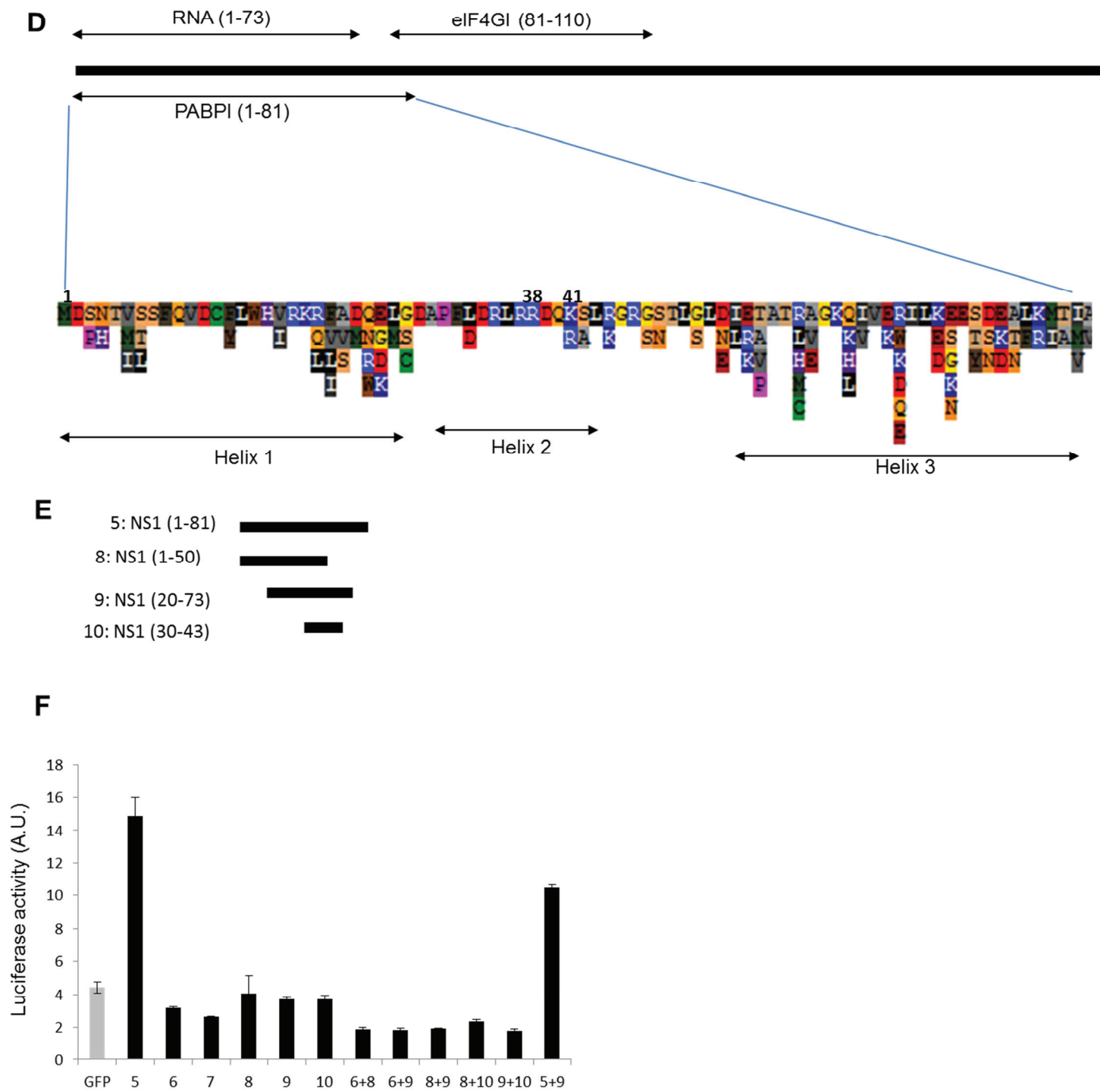


Figure 4

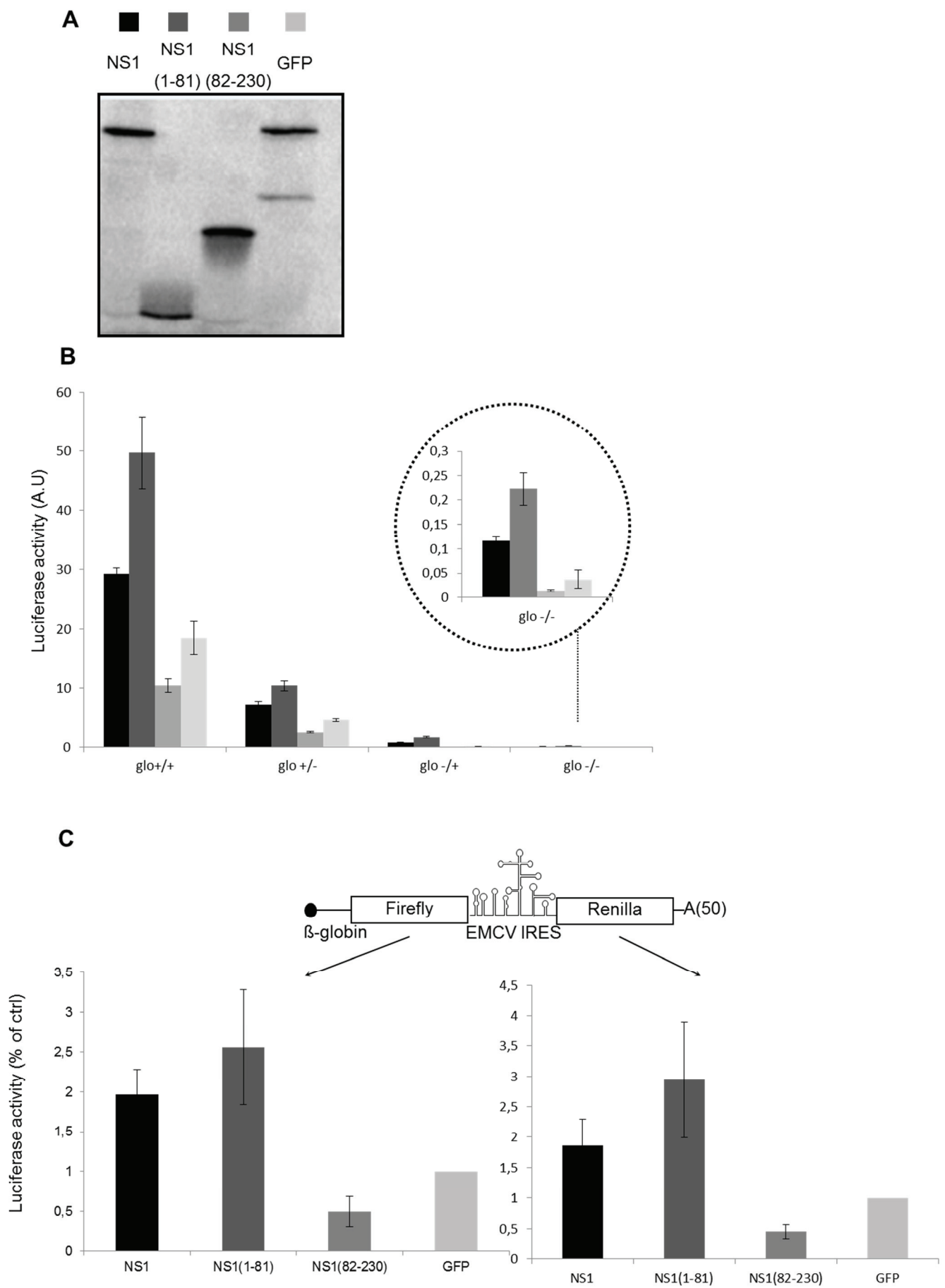
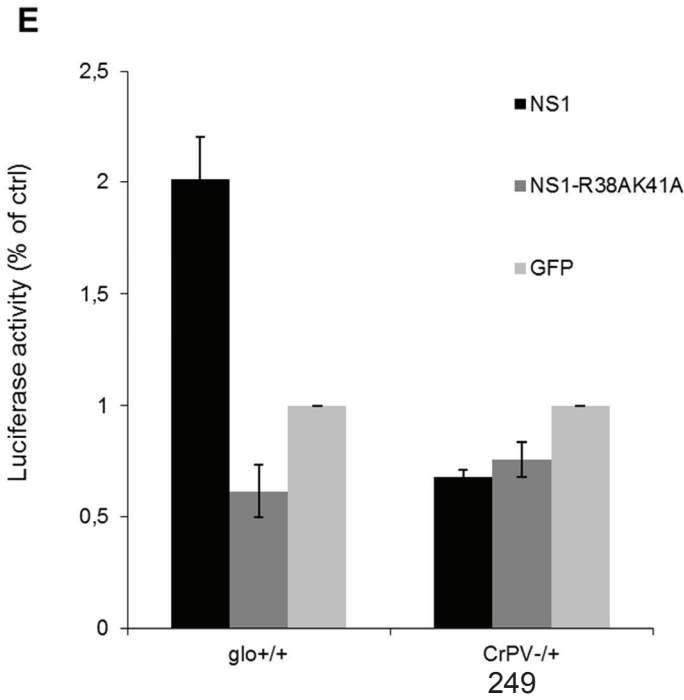
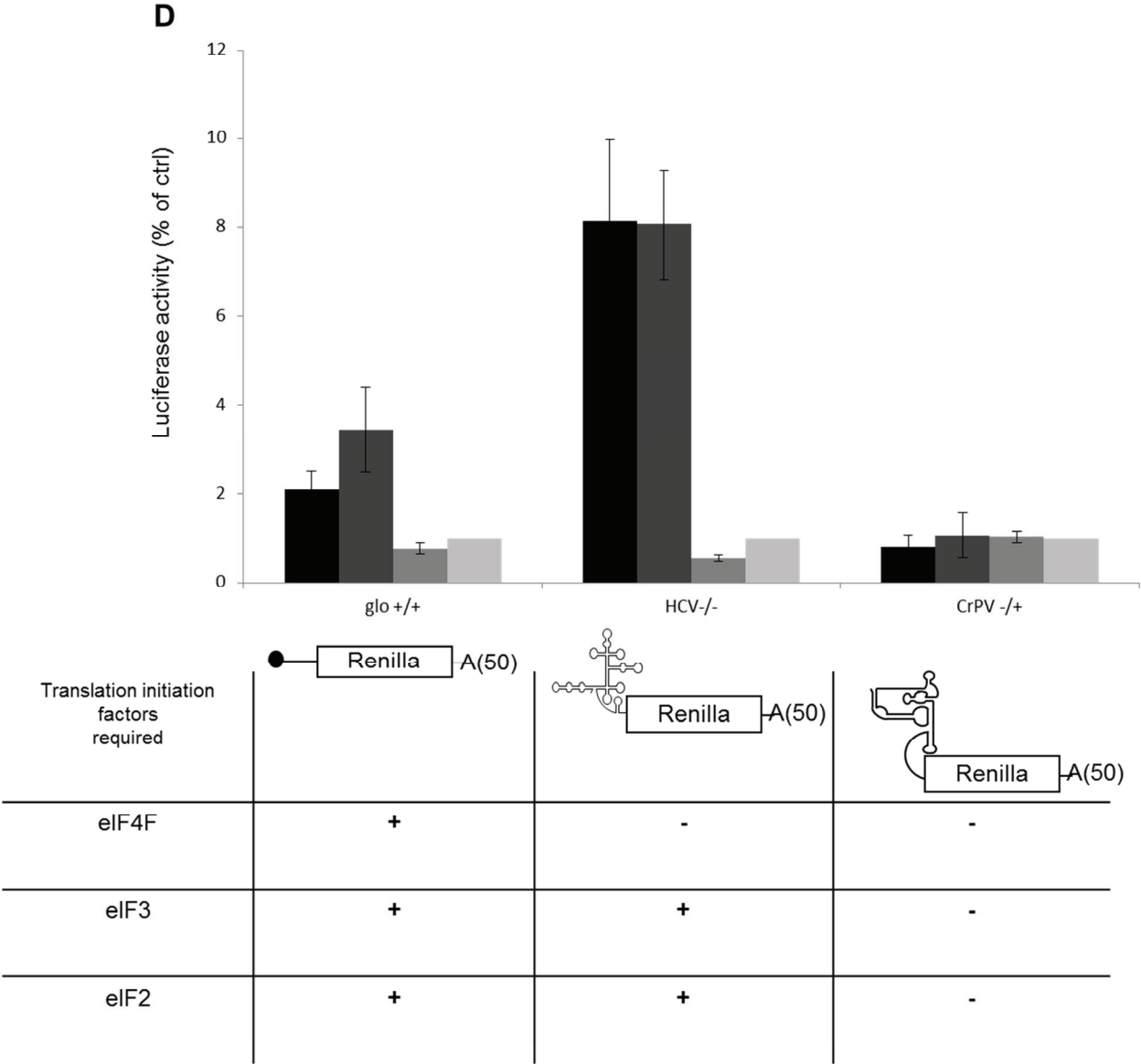


Figure 4





## References

- Aragón, T., de la Luna, S., Novoa, I., Carrasco, L., Ortín, J., and Nieto, A. (2000). Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of Influenza virus. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6259–6268.
- Beaton, A.R., and Krug, R.M. (1981). Selected host cell capped RNA fragments prime Influenza viral RNA transcription in vivo. *Nucleic Acids Res.* 9, 4423–4436.
- Bergmann, M., and Muster, T. (1995). The relative amount of an Influenza A virus segment present in the viral particle is not affected by a reduction in replication of that segment. *J. Gen. Virol.* 76 ( Pt 12), 3211–3215.
- Burgui, I., Aragón, T., Ortín, J., and Nieto, A. (2003). PABP1 and eIF4GI associate with Influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J. Gen. Virol.* 84, 3263–3274.
- Cassetti, M.C., Noah, D.L., Montelione, G.T., and Krug, R.M. (2001). Efficient translation of mRNAs in Influenza A virus-infected cells is independent of the viral 5' untranslated region. *Virology* 289, 180–185.
- Caton, A.J., and Robertson, J.S. (1980). Structure of the host-derived sequences present at the 5' ends of Influenza virus mRNA. *Nucleic Acids Res.* 8, 2591–2603.
- Desmet, E.A., Bussey, K.A., Stone, R., and Takimoto, T. (2013). Identification of the Nterminal domain of the Influenza virus PA responsible for the suppression of host protein synthesis. *J. Virol.* 87, 3108–3118.
- Dias, A., Bouvier, D., Crépin, T., McCarthy, A.A., Hart, D.J., Baudin, F., Cusack, S., and Ruigrok, R.W.H. (2009). The cap-snatching endonuclease of Influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* 458, 914–918.
- Elton, D., Simpson-Holley, M., Archer, K., Medcalf, L., Hallam, R., McCauley, J., and Digard,

P. (2001). Interaction of the Influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J. Virol.* 75, 408–419.

Enami, M., Fukuda, R., and Ishihama, A. (1985). Transcription and replication of eight RNA segments of Influenza virus. *Virology* 142, 68–77.

Falcón, A.M., Fortes, P., Marión, R.M., Beloso, A., and Ortín, J. (1999). Interaction of Influenza virus NS1 protein and the human homologue of Staufen in vivo and in vitro. *Nucleic Acids Res.* 27, 2241–2247.

Furuse, Y., and Oshitani, H. (2011). Evolution of the Influenza A virus untranslated regions. *Infect. Genet. Evol.* 11, 1150–1154.

Garfinkel, M.S., and Katze, M.G. (1993). Translational control by Influenza virus. Selective translation is mediated by sequences within the viral mRNA 5'-untranslated region. *J. Biol. Chem.* 268, 22223–22226.

Gingras, A.C., Raught, B., and Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 913–963.

Hale, B.G., Randall, R.E., Ortín, J., and Jackson, D. (2008). The multifunctional NS1 protein of Influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* 89, 2359–2376.

Hatada, E., and Fukuda, R. (1992). Binding of Influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro. *J. Gen. Virol.* 73 ( Pt 12), 3325–3329.

Hinnebusch, A.G. (2011). Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75, 434–467.

Johnson, N.P.A.S., and Mueller, J. (2002). Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 “Spanish” Influenza pandemic. *Bull Hist Med* 76, 105–115.

Kouba, T., Rutkai, E., Karásková, M., and Valášek, L.S. (2012). The eIF3c/NIP1 PCI domain

interacts with RNA and RACK1/ASC1 and promotes assembly of translation preinitiation complexes. *Nucleic Acids Res.* 40, 2683–2699.

Li, S., Min, J.-Y., Krug, R.M., and Sen, G.C. (2006). Binding of the Influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA. *Virology* 349, 13–21.

Marión, R.M., Zürcher, T., de la Luna, S., and Ortín, J. (1997). Influenza virus NS1 protein interacts with viral transcription-replication complexes in vivo. *J. Gen. Virol.* 78 ( Pt 10), 2447–2451.

Reynolds, J.E., Kaminski, A., Carroll, A.R., Clarke, B.E., Rowlands, D.J., and Jackson, R.J. (1996). Internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA: the ribosome entry site is at the authentic initiation codon. *RNA* 2, 867–878.

Satterly, N., Tsai, P.-L., van Deursen, J., Nussenzveig, D.R., Wang, Y., Faria, P.A., Levay, A., Levy, D.E., and Fontoura, B.M.A. (2007). Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A.* 104, 1853–1858.

Smith, G.L., and Hay, A.J. (1982). Replication of the Influenza virus genome. *Virology* 118, 96–108.

Taubenberger, J.K. (2006). The origin and virulence of the 1918 “Spanish” Influenza virus. *Proc Am Philos Soc* 150, 86–112.

Wang, L., and Lee, C.-W. (2009). Sequencing and mutational analysis of the non-coding regions of Influenza A virus. *Vet. Microbiol.* 135, 239–247.

Yángüez, E., Rodríguez, P., Goodfellow, I., and Nieto, A. (2012). Influenza virus polymerase confers independence of the cellular cap-binding factor eIF4E for viral mRNA translation. *Virology* 422, 297–307.

### **3. Annexe 1 : Exemple d'utilisation du système hybride pour des systèmes viraux complexes : Analyse de la coiffe dépendance des ARNm du virus de l'Influenza A**

En utilisant des fractions ribosomales issues de cellules infectées, le système hybride permet de caractériser le mécanisme d'initiation de la traduction de systèmes viraux complexes. En reprenant notre objectif initial qui est d'étudier le contrôle traductionnel du virus de l'Influenza A, nous avons isolé les fractions ribosomales (C100) de cellules préalablement infectées par la souche PR8 à une MOI de 4 pendant 8h (Fig. 1A). L'analyse par cytométrie en flux des cellules après marquage par immunofluorescence de la protéine virale NP montre que plus de 85% des cellules sont infectées ce qui permet d'obtenir un pool globalement homogène de ribosomes « infectés ».

Le protocole qui est décrit dans l'article 1 reste inchangé et les protéines exprimées sont visualisées par autoradiographie après incorporation de [<sup>35</sup>S]-méthionine. Dans le cas de C100 issus de cellules infectées par le virus de l'Influenza A, les protéines virales cytosoliques néosynthétisées (PB2, PB1, PA, NP, M1, NS1) sont bien visibles sur les deux autoradiographies présentées (Fig. 1B et 2).

Dans cette expérience (Fig. 1B), nous nous sommes intéressés à la traduction coiffe dépendante des ARNm viraux. Dans un premier temps, l'ajout d'analogue de la coiffe, m<sup>7</sup>GTP, à une concentration finale de 10µM montre que la traduction des ARNm viraux est inhibée comme c'est le cas pour l'ARN avec la 5'UTR de globine (gloRen, 2,7nM concentration finale). Dans une autre série d'expérience (Fig. 2), 0,2µL de protéase L (pL) produite *in vitro* dans le RRL est ajoutée au réactif

traductionnel avec 2,7nM d'un ARN bicistronique qui contient l'IRES de EMCV dans l'espace intercistronique.

Ces résultats montrent que la traduction des ARNm viraux est fortement affectée si la reconnaissance de la coiffe par eIF4E est inhibée ou si le facteur eIF4G est clivé. Ces observations confirment que la traduction des ARNm viraux est coiffe dépendante. D'autre part, les ARN ectopiques issus de gènes rapporteurs luciférase sont bien exprimés en présence de ribosomes infectés et en présence d'ARNm viraux Influenza compétiteurs. Il ne semble donc pas y avoir de modifications profondes de l'appareil traductionnel au cours de l'infection par l'Influenza A. Cependant, cette conclusion doit être modulée car les ARNs contrôles transcrits *in vitro* sont ajouté en très grande quantité en comparaison avec des ARNm qui seraient présents en cellule. D'autres expériences complémentaires en utilisant des gammes de concentration en ARN permettront de préciser ces premiers résultats. D'autres inhibiteurs de la traduction ajoutés au système hybride comme la puromycine, la cycloheximide, l'hippuristanol ou l'ajout de poly(rA) pourront également permettre de mieux caractériser le mécanisme de traduction utilisé par les ARNm issus du virus de l'Influenza A.

## Légendes des figures

### Figure 1

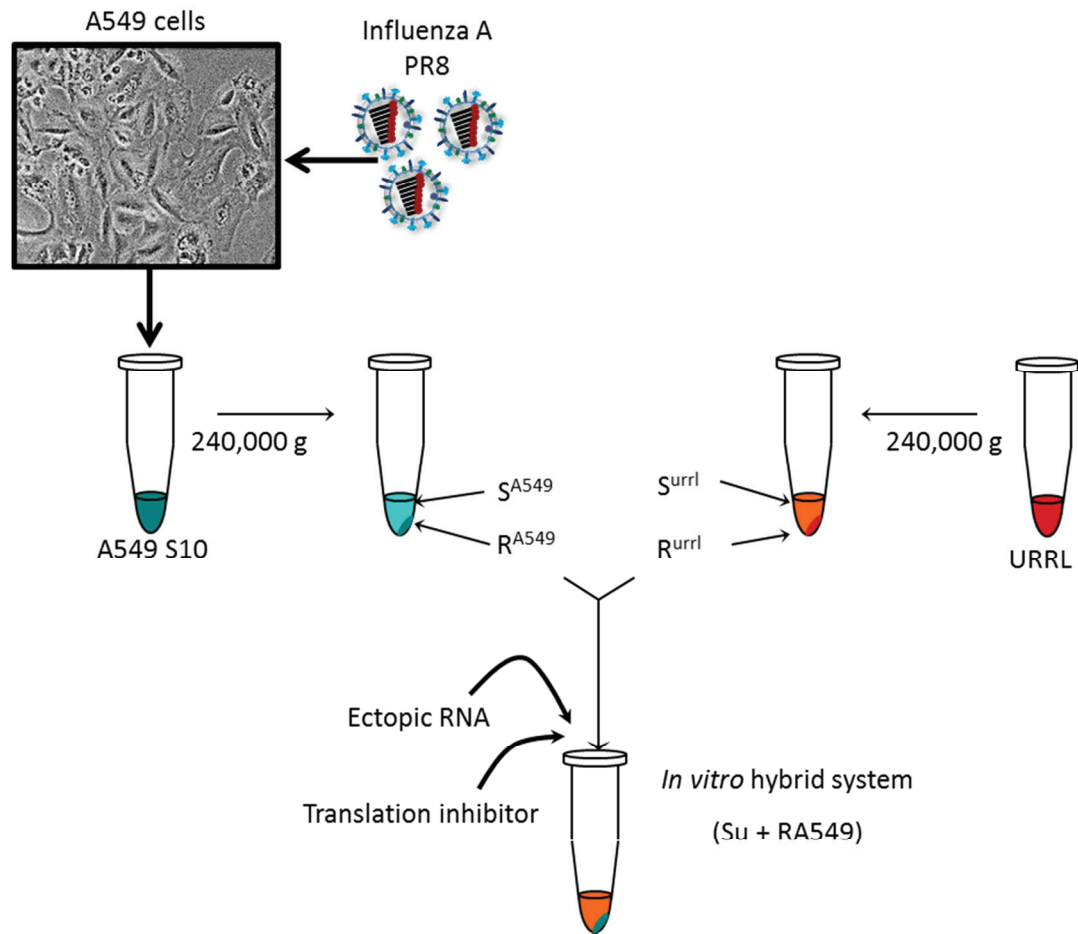
(A) Diagramme schématique résumant le protocole de préparation des ribosomes issus de cellules non infectées (RA549) ou infectées par la souche virale Influenza A/PR8/1934(H1N1) (RA549-PR8) avec le protocole décrit dans l'article I. Brièvement les culots cytoplasmiques des cellules contrôles ou infectées sont resuspendus et ajoutés au surnageant de réticulocytes de lapin (Su).

(B) Autoradiogramme montrant la production de protéines virales et de la protéine renilla après avoir incubé 1µg des différentes fractions ribosomales (RA549 ou RA549-PR8) pendant 30 minutes en présence de [<sup>35</sup>S]-méthionine. Cette incubation a eu lieu en présence, ou absence de m<sup>7</sup>GTP (10µM) comme indiqué sur la figure.

### Figure 2

Autoradiogramme montrant la production de protéines virales et l'expression des gènes rapporteurs renilla et firefly luciférase issus d'un ARN bicistronique transcrit *in vitro* (représenté schématiquement en haut de la figure). Pour ce faire, 1µg des différentes fractions ribosomales (RA549 ou RA549-PR8) ont été incubées pendant 30 minutes en présence de [<sup>35</sup>S]-méthionine. Cette incubation a eu lieu en présence, ou absence de la protéase L du FMDV (0,2µL produit en RRL) comme indiqué sur la figure.

**Fig. 1A**



**Fig. 1B**

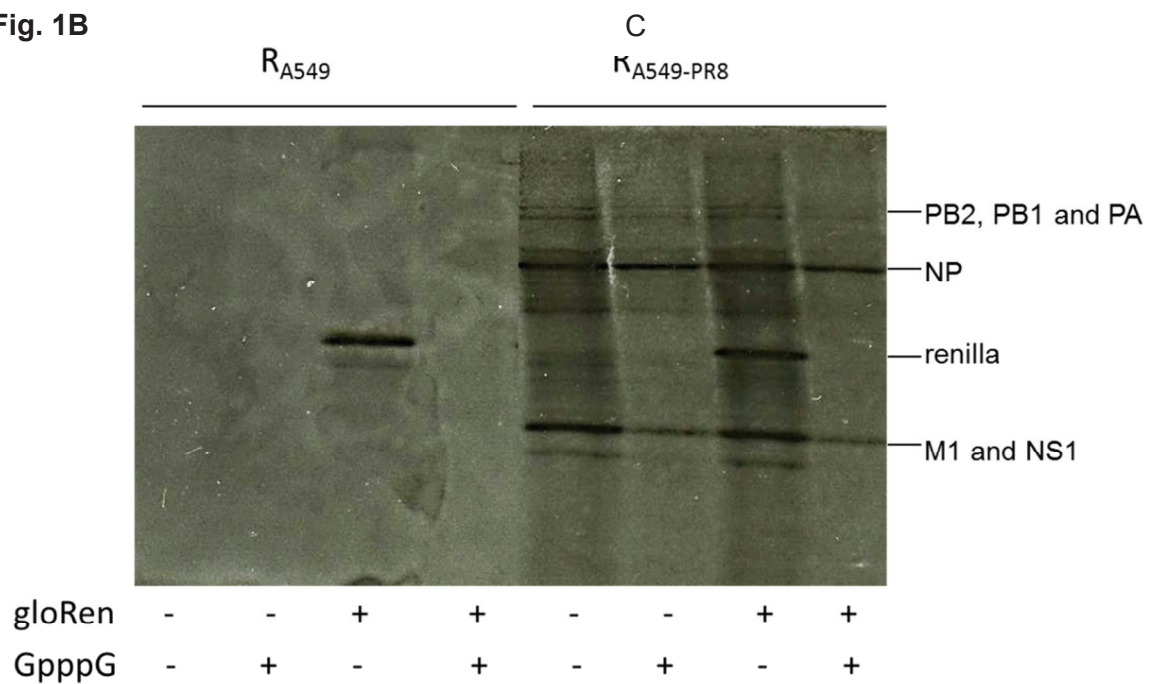
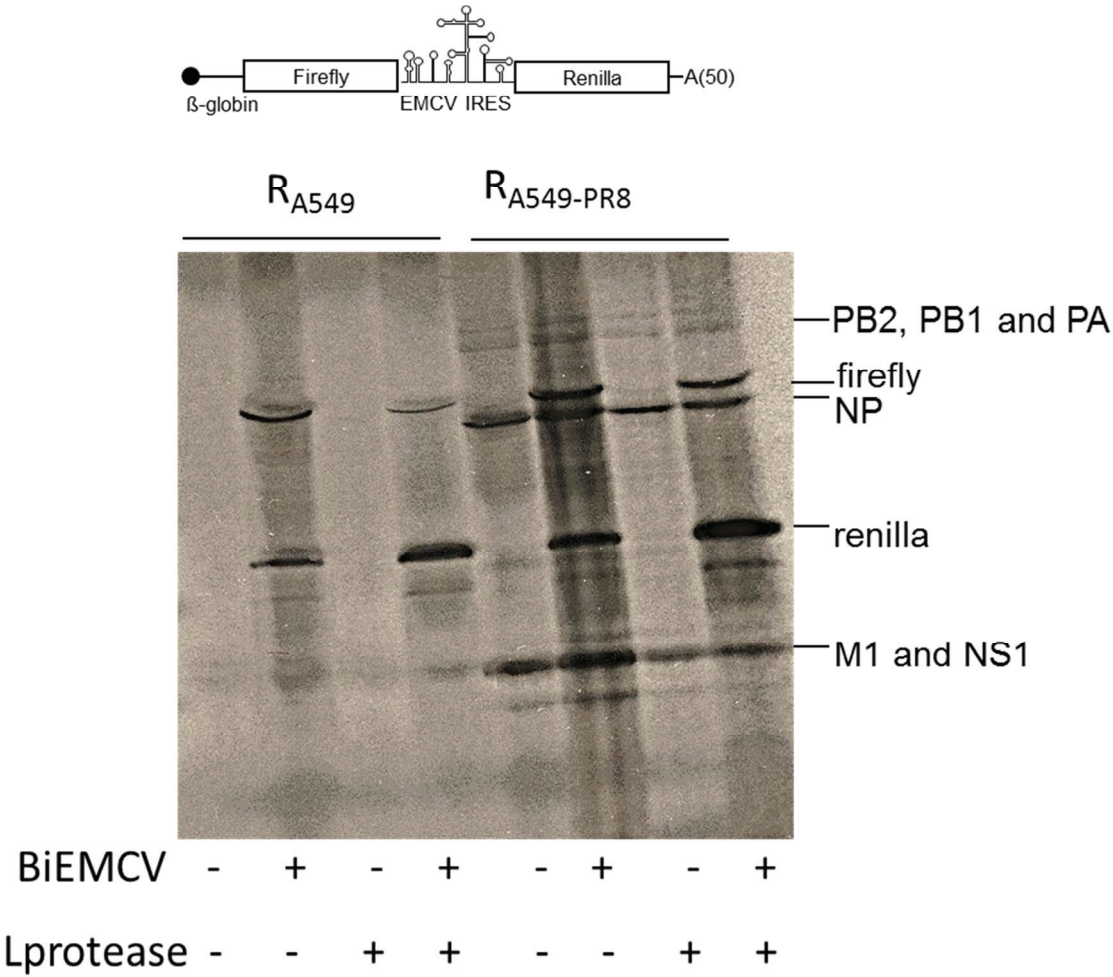


Fig. 2





---

# **PARTIE III :**

# **DISCUSSION<sub>et</sub>**

# **PERSPECTIVES**

---

# Chapitre I: Des systèmes *in vitro* pour étudier la traduction chez les Mammifères

## 1 Des systèmes indispensables

La traduction n'est qu'une étape intermédiaire de l'expression génique, elle est dépendante des étapes qui la précèdent et conditionne les suivantes (figure 1). Les systèmes *in vitro* d'études de la traduction isolent cette étape, ce qui permet son étude. Leurs avantages résident en particulier dans leurs caractéristiques de système ouvert ce qui permet d'ajouter ou supprimer de manière ponctuelle un, ou plusieurs, éléments qui interviennent dans la régulation de ce processus. De plus, ils permettent d'obtenir rapidement des réponses par comparaison aux systèmes cellulaires et peuvent donc être employés comme approche préliminaire à une étude plus large. Enfin ils ne nécessitent pas de conditions de laboratoire ou structures particulières ce qui favorise leur utilisation routinière en recherche.

## 2 Les limites des lysats « classiques »

La question des limites est une question importante pour tout scientifique qui utilise un système *in vitro*. Dès la preuve de fonctionnalité des lysats eucaryotes (figure 37), plusieurs hypothèses ont été suggérées. La cellule eucaryote est une structure très compartimentée et la lyse membranaire peut entraîner la mise en contact d'éléments inhibiteurs de la traduction comme des ribonucléases et des protéases issues de différents compartiments cytoplasmiques et nucléaires (protéasome, endosomes, lysosomes). De plus, une contamination du lysat primaire par de l'ADN génomique pourrait entraîner la rétention de sels qui inhibent la

synthèse des protéines. Inversement, un excès de sels est néfaste vis-à-vis de la synthèse protéique. Cet effet, initialement observé par Jackson <sup>269</sup> a été retrouvé dans de nombreuses publications qui montrent par exemple que certaines IRES virales ont une dépendance très stricte dans la concentration en potassium et magnésium *in vitro* <sup>320,321</sup>. Les lysats cellulaires sont d'ailleurs commercialisés avec des échantillons de sels (acétate de potassium et dichlorure de magnésium) à ajouter dans le mix traductionnel comme initialement suggéré par Jackson et collègues. Précisons que le système hybride est lui aussi fortement sel dépendant. Des gammes de concentration ont été réalisées et les meilleurs rendements de néosynthèse protéique ont été obtenus avec des concentrations finales de 75 mM de potassium et 0,75 mM de magnésium.

La présence de facteurs solubles et leur concentration dans le lysat peuvent également influencer la traduction. Il a été montré que, par exemple, le ratio de eIF3 par rapport aux ribosomes est de 2:1 en cellules HeLa, alors qu'il est de 0,5:1 en RRL <sup>77</sup>. Or, en cellule, les protéines qui constituent ce complexe ne sont pas uniquement retrouvées dans les polysomes et peuvent être localisées dans des granules de stress, des p-bodies et également dans le noyau <sup>82,87</sup>. Ainsi, lors de la préparation d'un lysat cellulaire compétent pour la traduction, des différences d'efficacités peuvent s'expliquer par une perturbation de la stœchiométrie des facteurs inhérents au mode de préparation. Lors de la mise au point du système hybride, nous avons essayé dans un premier temps de générer un lysat qui possède une concentration de protéines totales comparable à celle du RRL. Ce système s'est avéré inefficace de même que reconstituer du RRL en cherchant à retrouver la même concentration initiale. Pour que notre système devienne exploitable, il a fallu diluer 10 à 20 fois le C100 pour qu'il fonctionne à son optimal et revienne à des

niveaux d'expression protéiques identiques à ceux du RRL natif. Ce résultat suggère soit une gêne stérique provoquée par un excès de complexes traductionnels, soit la présence d'un inhibiteur en excès qui doit être dilué. De la même façon, d'après nos résultats, le lysat commercialisé (uRRL) peut voir son rendement amélioré uniquement en le diluant dans de l'eau.

Enfin, la cellule est une unité biologique très dynamique. De nombreuses études ont montré que la synthèse protéique globale varie beaucoup selon les différentes phases du cycle cellulaire, notamment lors de la mitose <sup>96</sup>. L'idéal pourrait être de synchroniser les cellules avant de préparer du lysat, mais c'est une étape délicate et stressante pour la cellule ce qui rend la fabrication des lysats souvent peu reproductible.

### **3 Les limites et perspectives du système hybride**

#### **3.1 Faiblesses et flexibilités du système hybride**

Le système hybride reste un système figé comme tous les systèmes *in vitro* qui ne reproduisent pas tous les événements en amont de la traduction. Ce point est donc une faiblesse à laquelle notre système n'échappe pas mais il peut être néanmoins contourné, ou en partie, notamment par l'utilisation d'un extrait ribosomal qui contient un ARNm d'intérêt et possédant une histoire nucléaire comme nous l'avons observé pour l'étude du gène c-myc.

De plus, la qualité principale d'un tel système réside dans sa flexibilité. En effet, c'est un système adaptable à tout type de cellules ce qui le rend spécifique pour chaque étude et permet de définir rapidement si des facteurs interviennent spécifiquement dans l'expression de protéines cibles.

### 3.2 Des perspectives pour des techniques de haut débit

Le système hybride est un système lié qui atteint des rendements de production protéiques semblables au RRL, soit de l'ordre du microgramme de protéines synthétisées par ml, ce qui est encore loin du rendement des extraits d'*E.coli* qui atteignent le mg/ml <sup>280</sup>. Il est donc pour l'instant trop tôt pour l'utiliser comme système de production de protéines mais il reste envisageable de l'améliorer en l'utilisant comme un système couplé (l'ARN est transcrit dans le même tube réactionnel grâce à une ARN polymérase ajoutée au système) voire en système continu en apportant de manière continue les substrats nécessaires à la synthèse protéique et ainsi permettre d'augmenter sa productivité (figure 39).

Les évolutions récentes des techniques de spectrométrie de masse ont accompagné l'essor de la protéomique et notamment la protéomique quantitative <sup>322,323</sup>. Les techniques d'analyse haut-débit des protéines requièrent de moins en moins de matériel et moins d'étapes de purification des complexes protéiques mais le marquage de ces polypeptides en cellules reste une étape très délicate. Actuellement, la technique de marquage en cellule par des acides aminés enrichis en isotopes stables (SILAC) est la technique la plus prometteuse. Pour ce faire, il faut pré-incuber plusieurs jours les cellules dans un milieu enrichi par exemple en lysine <sup>12</sup>C dite légère et <sup>13</sup>C dite lourde qui seront incorporées dans les polypeptides néosynthétisés. Les fragments de polypeptides contenant les isotopes lourds, seront ensuite détectés par spectrométrie de masse et quantifiés. La technique de SILAC reste cependant limitante car l'incorporation d'acides aminés marqués pourrait être source de stress cellulaire et aboutir à des biais dans le profil d'expression protéique ou encore, les acides aminés peuvent-être métabolisés et ainsi modifier le marquage initialement attendu <sup>318</sup>. Le système hybride permet d'envisager une nouvelle

approche pour réaliser du SILAC. Le C100 issu des cellules contient toujours les ARNm associés aux polysomes et il serait donc possible de marquer les protéines exprimées *in vitro* avant de les analyser par spectrométrie de masse. Il permettrait ainsi de regarder le profil d'expression protéique à un temps donné sans avoir à conditionner les cellules pendant plusieurs jours. En se basant sur cette perspective, le système hybride serait plus économe car il nécessiterait beaucoup moins de matériel notamment moins d'acides aminés marqués. De plus les acides aminés marqués aux isotopes stables pourraient être remplacés par des marqueurs moins coûteux comme des acides aminés biotinylés.

L'étude du détournement de la traduction par le virus de l'Influenza A pourrait également être envisagée avec le système hybride en utilisant du C100 de cellules infectées. Des résultats préliminaires montrent que l'expression des ARNm viraux associés aux polysomes est nettement détectable par radiomarquage à la [<sup>35</sup>S]-méthionine (conférer annexe aux résultats). On peut ainsi envisager de recréer *in vitro* l'environnement traductionnel associé à l'infection virale pour mieux l'étudier.

# Chapitre II : Influenza A et traduction

## 1 Stimulation de la traduction en contexte infectieux

### 1.1 Révision et approfondissement des données antérieures

Les évènements nucléaires étant fortement perturbés lors d'une infection de l'hôte par le virus de l'Influenza A, l'étude du rôle des 5'UTR virales sur la traduction a souffert de la technique de transfection d'ADNc qui passe par un processus nucléaire.

L'étude du rôle de NS1 dans la traduction est également rendue difficile en raison de ses multiples fonctions qui interviennent à toutes les étapes de l'expression des gènes. Ainsi, NS1 est impliquée dans la transcription, la maturation, la stabilité et l'export des ARNm pour ses fonctions nucléaires et dans l'initiation de la traduction pour ses fonctions cytoplasmiques<sup>189</sup>. Ainsi, lors de l'expression de NS1 à partir d'un ADNc, il peut être difficile d'isoler son rôle au niveau traductionnel de ses autres fonctions. C'est pour cela que nous avons eu recours à méthode de transfection d'ARN en cellule et des études *in vitro* en RRL. Grâce à cela, nous avons pu montrer que la coiffe et la queue poly(A) ne sont pas nécessaires à l'effet de la protéine NS1 et les ARNm viraux ne sont pas plus stimulés que les ARNm cellulaires. Ces premiers résultats nous ont permis de nous orienter vers la recherche d'un rôle plus global de la stimulation de la traduction par la protéine NS1. L'utilisation de protéines tronquées et mutées a permis d'écarter l'interaction directe entre les protéines NS1 et eIF4G comme élément majeur de la stimulation de la traduction par la protéine NS1<sup>231</sup>. L'étude menée au travers de différentes constructions contenant des IRES spécialisées a montré que NS1 agissait de manière indépendante de eIF4F mais pas

de eIF3. Des résultats préliminaires de co-immunoprécipitations de NS1 et eIF3 vont dans ce sens et nous amènent à proposer un modèle où NS1 pourrait directement recruter eIF3 à l'ARNm ce qui jouerait un rôle crucial dans la stimulation de l'initiation et également dans le recyclage des éléments de la traduction (données non publiées). Les interactions NS1-eIF4G<sup>231</sup> et NS1-PABP1<sup>261</sup>, quant-à-elles, favoriseraient sa localisation au niveau des polysomes ou interviendraient à d'autres niveaux de régulation de la traduction.

## **1.2 La stratégie de l'Influenza A, une stratégie pertinente**

Le shut off cellulaire est un effet majeur qui résulte de l'infection par le virus de l'Influenza A (Figure 32). On peut émettre l'hypothèse d'un shut-off qui serait mis en place au niveau nucléaire et en replaçant notre étude dans le contexte global de l'infection, la stimulation globale de la synthèse des protéines cellulaires et virales reste une stratégie intéressante car elle permettrait au virus de jouer sur deux tableaux. Dans un premier temps cette stimulation favorise l'expression des protéines virales qui vont permettre au virus d'achever ses premiers cycles de réplication dans de brefs délais et bourgeonner pour infecter d'autres cellules à proximité pour devancer l'organisme infecté dans la mise en place des réponses immunitaires. Dans un second temps, la stimulation de la traduction des ARNm cellulaires présents avant les événements nucléaires qui affectent la cellule, permettrait de maintenir un peu plus longtemps la cellule dans un état favorable à la réplication virale et ainsi accorder au virus des cycles de réplication supplémentaires avant l'entrée en apoptose.



### **1.3 Une stratégie qui se retrouve chez d'autres virus**

Parmi la diversité des stratégies infectieuses développées par les virus au détriment de leurs hôtes, la stratégie de l'Influenza A de stimuler la traduction n'est pas un cas isolé (<sup>89</sup> pour revue). D'autres virus expriment des protéines qui augmentent la traduction de manière non ciblée. Il a ainsi été montré que la protéine EB2 du virus d'Epstein Barr permet de mieux traduire un gène rapporteur indépendamment de la quantité en ARNm et par un mécanisme encore inconnu <sup>324</sup>. Des homologues d'EB2 dans d'autres familles d'herpèsvirus jouent également un rôle similaire en interagissant avec les facteurs d'initiation comme la protéine ICP27 du virus de l'herpès simplex 1 (HSV1) qui lie directement la PABP1 pour stimuler la traduction <sup>325,326</sup> ou encore ORF57 de l'herpèsvirus, associé au sarcome de Kaposi (KSHV), qui lie la protéine PYM pour recruter la petite sous-unité ribosomale directement sur l'ARNm <sup>327</sup>. Enfin l'étude du transactivateur (TAV) du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) montre que ce dernier interagit avec la protéine eIF3g et la protéine ribosomale RPL24 dans des protoplastes de plante et stimule le recyclage des éléments indispensables à la traduction des ARNm <sup>328</sup>.

En cellule, des facteurs additionnels et exprimés ponctuellement peuvent intervenir pour une meilleure efficacité de la traduction globale. C'est le cas de la protéine d'interaction à la PABPI (PAIPI) qui possède un domaine homologue à eIF4G et facilite l'initiation de la traduction en se liant à la PABPI <sup>101</sup>.

## **2 Applications antivirales et technologiques**

### **2.1 Place de la protéine NS1 dans la lutte antivirale**

La protéine NS1 qui est multifonctionnelle est une cible de choix dans la lutte contre le virus de l'Influenza A. Dans cette optique, un inhibiteur de l'interaction NS1-

CPSF30 a été mis au point en 2006 <sup>329</sup> montrant une limitation dans la réplication virale. Malheureusement, l'apparition rapide de mutants qui contournent l'inhibition de cette interaction a rapidement induit une résistance du virus. Il serait donc intéressant de déterminer dans un premier temps les conséquences sur la réplication virale d'une protéine NS1 qui ne stimulerait plus la traduction puis éventuellement de déterminer des inhibiteurs ciblés contre le domaine de liaison à l'ARN de NS1.

D'autre part, nous avons décidé de focaliser notre étude sur la protéine NS1 de la souche PR8 qui est systématiquement utilisée pour augmenter la production de vaccins dirigés contre les nouvelles souches annuelles. On pourrait ainsi imaginer que cet effet de la souche PR8 pourrait être dû à l'activité de NS1. Dans la perspective future d'une synthèse de vaccin en cellules et non plus sur œuf, l'utilisation de lignées exprimant stablement la protéine NS1 pourrait être une piste dans le cadre d'une recherche visant à optimiser la production d'antigènes viraux.

## **2.2 Un complément pour les systèmes de production de protéines**

Les systèmes *in vitro* de production des protéines doivent aujourd'hui relever plusieurs défis pour leur mise en place à l'échelle industrielle tels que le coût des constituants essentiels, le renouvellement des molécules énergétiques, l'élimination des déchets et l'augmentation des rendements <sup>280</sup>. Dans cette optique, l'utilisation de NS1 mais aussi d'autres protéines (ICP27, TAV, PAIP1...) comme protéines accessoires permettrait de stimuler le rendement de ces systèmes sur une même échelle de temps. Notre étude montre que la région NS1(1-81) est même suffisante pour jouer un rôle de stimulateur de la traduction *in vitro*, ce qui permet d'envisager de faire produire chimiquement ce polypeptide à moindre coût.

---

# BIBLIOGRAPHIE

---

## 1 Ouvrages

### Fields Virology

David M. Knipe (Editor), Peter M. Howley MD (Editor), Diane E. Griffin MD PhD (Editor), Robert A. Lamb PhD ScD (Editor), Malcolm A. Martin MD (Editor), Bernard Roizman (Editor), Stephen E. Straus (Editor)

5th Edition (2 Volume Set), 2005, 3280 pages, Lippincott Williams & Wilkins

### La grippe ou Influenza

Grégoire André

Paris: Masson, 1908

### The 1918 pandemic of Influenza in Canton, China

William Warder Cadbury

Canton, China: Canton Christian College, 1919

### Annals of Influenza or epidemic catarrhal fever in Great Britain from 1510 to 1837

Theophilus Thompson

London : Sydenham society, 1852

### Microbiologie

Lansing M. Prescott, John P. Harley, Donald A. Klein

De Boeck, 2003, 1137 pages

## 2 Articles de périodiques

1. Berget, S. M., Moore, C. & Sharp, P. A. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 3171 (1977).
2. Topisirovic, I. & Sonenberg, N. Translational control by the eukaryotic ribosome. *Cell* **145**, 333–334 (2011).
3. Takagaki, Y., Ryner, L. C. & Manley, J. L. Separation and characterization of a poly(A) polymerase and a cleavage/specificity factor required for pre-mRNA polyadenylation. *Cell* **52**, 731–742 (1988).
4. Bienroth, S., Keller, W. & Wahle, E. Assembly of a processive messenger RNA polyadenylation complex. *EMBO J.* **12**, 585–594 (1993).
5. Moore, M. J. & Proudfoot, N. J. Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* **136**, 688–700 (2009).
6. Eulalio, A., Huntzinger, E. & Izaurralde, E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* **132**, 9–14 (2008).
7. Ross, J. F. & Orlowski, M. Growth-rate-dependent adjustment of ribosome function in chemostat-grown cells of the fungus *Mucor racemosus*. *J. Bacteriol.* **149**, 650–653 (1982).
8. Pisarev, A. V., Hellen, C. U. T. & Pestova, T. V. Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. *Cell* **131**, 286–299 (2007).
9. Laurino, J. P., Thompson, G. M., Pacheco, E. & Castilho, B. A. The beta subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 binds mRNA through the lysine repeats and a region comprising the C2-C2 motif. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 173–181 (1999).
10. Hinnebusch, A. G. Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **75**, 434–467, first page of table of contents (2011).
11. Asano, K., Clayton, J., Shalev, A. & Hinnebusch, A. G. A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA(Met) is an important translation initiation intermediate in vivo. *Genes Dev.* **14**, 2534–2546 (2000).
12. Mitchell, S. F. *et al.* The 5'-7-methylguanosine cap on eukaryotic mRNAs serves both to stimulate canonical translation initiation and to block an alternative pathway. *Mol. Cell* **39**, 950–962 (2010).
13. Sokabe, M., Fraser, C. S. & Hershey, J. W. B. The human translation initiation multifactor complex promotes methionyl-tRNA<sub>i</sub> binding to the 40S ribosomal subunit. *Nucleic Acids Res.* **40**, 905–913 (2012).
14. Asano, K., Clayton, J., Shalev, A. & Hinnebusch, A. G. A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA(Met) is an important translation initiation intermediate in vivo. *Genes Dev.* **14**, 2534–2546 (2000).
15. Hinton, T. M., Coldwell, M. J., Carpenter, G. A., Morley, S. J. & Pain, V. M. Functional analysis of individual binding activities of the scaffold protein eIF4G. *J. Biol. Chem.* **282**, 1695–1708 (2007).
16. Clarkson, B. K., Gilbert, W. V. & Doudna, J. A. Functional overlap between eIF4G isoforms in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* **5**, e9114 (2010).
17. Kozak, M. How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell* **15**, 1109–1123 (1978).
18. Kozak, M. & Shatkin, A. J. Migration of 40 S ribosomal subunits on messenger RNA in the presence of edeine. *J. Biol. Chem.* **253**, 6568–6577 (1978).
19. Pestova, T. V. & Kolupaeva, V. G. The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev.* **16**, 2906–2922 (2002).
20. Soto-Rifo, R., Rubilar, P. S. & Ohlmann, T. The DEAD-box helicase DDX3 substitutes for the cap-binding protein eIF4E to promote compartmentalized translation initiation of the HIV-1 genomic RNA. *Nucleic Acids Res.* (2013). doi:10.1093/nar/gkt306

21. Pöyry, T. A. A., Kaminski, A. & Jackson, R. J. What determines whether mammalian ribosomes resume scanning after translation of a short upstream open reading frame? *Genes Dev.* **18**, 62–75 (2004).
22. Pöyry, T. A. A., Kaminski, A., Connell, E. J., Fraser, C. S. & Jackson, R. J. The mechanism of an exceptional case of reinitiation after translation of a long ORF reveals why such events do not generally occur in mammalian mRNA translation. *Genes Dev.* **21**, 3149–3162 (2007).
23. Ingolia, N. T., Ghaemmaghami, S., Newman, J. R. S. & Weissman, J. S. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* **324**, 218–223 (2009).
24. Kozak, M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* **15**, 8125–8148 (1987).
25. Kozak, M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**, 283–292 (1986).
26. Kozak, M. Effects of long 5' leader sequences on initiation by eukaryotic ribosomes in vitro. *Gene Expr.* **1**, 117–125 (1991).
27. Grifo, J. A., Tahara, S. M., Morgan, M. A., Shatkin, A. J. & Merrick, W. C. New initiation factor activity required for globin mRNA translation. *J. Biol. Chem.* **258**, 5804–5810 (1983).
28. Siddiqui, N. *et al.* Structural insights into the allosteric effects of 4EBP1 on the eukaryotic translation initiation factor eIF4E. *J. Mol. Biol.* **415**, 781–792 (2012).
29. Sonenberg, N., Morgan, M. A., Merrick, W. C. & Shatkin, A. J. A polypeptide in eukaryotic initiation factors that crosslinks specifically to the 5'-terminal cap in mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 4843–4847 (1978).
30. Sonenberg, N., Rupprecht, K. M., Hecht, S. M. & Shatkin, A. J. Eukaryotic mRNA cap binding protein: purification by affinity chromatography on sepharose-coupled m7GDP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 4345–4349 (1979).
31. Marcotrigiano, J., Gingras, A. C., Sonenberg, N. & Burley, S. K. Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell* **89**, 951–961 (1997).
32. Carberry, S. E., Friedland, D. E., Rhoads, R. E. & Goss, D. J. Binding of protein synthesis initiation factor 4E to oligoribonucleotides: effects of cap accessibility and secondary structure. *Biochemistry* **31**, 1427–1432 (1992).
33. Youtani, T., Tomoo, K., Ishida, T., Miyoshi, H. & Miura, K. Regulation of human eIF4E by 4E-BP1: binding analysis using surface plasmon resonance. *IUBMB Life* **49**, 27–31 (2000).
34. Pause, A., Méthot, N., Svitkin, Y., Merrick, W. C. & Sonenberg, N. Dominant negative mutants of mammalian translation initiation factor eIF-4A define a critical role for eIF-4F in cap-dependent and cap-independent initiation of translation. *EMBO J.* **13**, 1205–1215 (1994).
35. Poulin, F., Gingras, A. C., Olsen, H., Chevalier, S. & Sonenberg, N. 4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. *J. Biol. Chem.* **273**, 14002–14007 (1998).
36. Gingras, A. C., Raught, B. & Sonenberg, N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 913–963 (1999).
37. Linder, P. & Slonimski, P. P. An essential yeast protein, encoded by duplicated genes TIF1 and TIF2 and homologous to the mammalian translation initiation factor eIF-4A, can suppress a mitochondrial missense mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 2286–2290 (1989).
38. Rozen, F. *et al.* Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 1134–1144 (1990).
39. Grifo, J. A., Abramson, R. D., Satler, C. A. & Merrick, W. C. RNA-stimulated ATPase activity of eukaryotic initiation factors. *J. Biol. Chem.* **259**, 8648–8654 (1984).

40. Bordeleau, M.-E. *et al.* RNA-mediated sequestration of the RNA helicase eIF4A by Pateamine A inhibits translation initiation. *Chem. Biol.* **13**, 1287–1295 (2006).
41. Mader, S., Lee, H., Pause, A. & Sonenberg, N. The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4990–4997 (1995).
42. Morino, S., Imataka, H., Svitkin, Y. V., Pestova, T. V. & Sonenberg, N. Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) binding site and the middle one-third of eIF4GI constitute the core domain for cap-dependent translation, and the C-terminal one-third functions as a modulatory region. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 468–477 (2000).
43. Ohlmann, T., Rau, M., Pain, V. M. & Morley, S. J. The C-terminal domain of eukaryotic protein synthesis initiation factor (eIF) 4G is sufficient to support cap-independent translation in the absence of eIF4E. *The EMBO journal* **15**, 1371 (1996).
44. Korneeva, N. L., Lamphear, B. J., Hennigan, F. L. & Rhoads, R. E. Mutually cooperative binding of eukaryotic translation initiation factor (eIF) 3 and eIF4A to human eIF4G-1. *J. Biol. Chem.* **275**, 41369–41376 (2000).
45. Ohlmann, T., Pain, V. M., Wood, W., Rau, M. & Morley, S. J. The proteolytic cleavage of eukaryotic initiation factor (eIF) 4G is prevented by eIF4E binding protein (PHAS-I; 4E-BP1) in the reticulocyte lysate. *The EMBO journal* **16**, 844–855 (1997).
46. Balvay, L., Lastra, M. L., Sargueil, B., Darlix, J.-L. & Ohlmann, T. Translational control of retroviruses. *Nature Reviews Microbiology* **5**, 128–140 (2007).
47. Ohlmann, T. *et al.* In Vitro Cleavage of eIF4GI but not eIF4GII by HIV-1 Protease and its Effects on Translation in the Rabbit Reticulocyte Lysate System. *Journal of Molecular Biology* **318**, 9–20 (2002).
48. Mangus, D. A., Evans, M. C. & Jacobson, A. Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol.* **4**, 223 (2003).
49. Adam, S. A., Nakagawa, T., Swanson, M. S., Woodruff, T. K. & Dreyfuss, G. mRNA polyadenylate-binding protein: gene isolation and sequencing and identification of a ribonucleoprotein consensus sequence. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 2932–2943 (1986).
50. Burd, C. G., Matunis, E. L. & Dreyfuss, G. The multiple RNA-binding domains of the mRNA poly(A)-binding protein have different RNA-binding activities. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3419–3424 (1991).
51. Kühn, U. & Pieler, T. Xenopus poly(A) binding protein: functional domains in RNA binding and protein-protein interaction. *J. Mol. Biol.* **256**, 20–30 (1996).
52. Baer, B. W. & Kornberg, R. D. Repeating structure of cytoplasmic poly(A)-ribonucleoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 1890–1892 (1980).
53. Baer, B. W. & Kornberg, R. D. The protein responsible for the repeating structure of cytoplasmic poly(A)-ribonucleoprotein. *J. Cell Biol.* **96**, 717–721 (1983).
54. Sachs, A. B., Davis, R. W. & Kornberg, R. D. A single domain of yeast poly(A)-binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 3268–3276 (1987).
55. Doel, M. T. & Carey, N. H. The translational capacity of deadenylated ovalbumin messenger RNA. *Cell* **8**, 51–58 (1976).
56. Hsu, M. T., Parvin, J. D., Gupta, S., Krystal, M. & Palese, P. Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 8140–8144 (1987).
57. Kopeina, G. S. *et al.* Step-wise formation of eukaryotic double-row polyribosomes and circular translation of polysomal mRNA. *Nucleic Acids Res.* **36**, 2476–2488 (2008).
58. Jacobson, A. & Favreau, M. Possible involvement of poly(A) in protein synthesis. *Nucleic Acids Res.* **11**, 6353–6368 (1983).
59. Tarun, S. Z., Jr & Sachs, A. B. Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J.* **15**, 7168–7177 (1996).
60. Piron, M., Vende, P., Cohen, J. & Poncet, D. Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J.* **17**, 5811–5821 (1998).



61. Imataka, H., Gradi, A. & Sonenberg, N. A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J.* **17**, 7480–7489 (1998).
62. Gray, N. K. & Wickens, M. Control of translation initiation in animals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 399–458 (1998).
63. Munroe, D. & Jacobson, A. mRNA poly(A) tail, a 3' enhancer of translational initiation. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 3441–3455 (1990).
64. Kahvejian, A., Svitkin, Y. V., Sukarieh, R., M'Boutchou, M.-N. & Sonenberg, N. Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev.* **19**, 104–113 (2005).
65. Borman, A. M., Michel, Y. M., Malnou, C. E. & Kean, K. M. Free poly(A) stimulates capped mRNA translation in vitro through the eIF4G-poly(A)-binding protein interaction. *J. Biol. Chem.* **277**, 36818–36824 (2002).
66. Ricci, E. P. *et al.* Activation of a microRNA response in trans reveals a new role for poly(A) in translational repression. *Nucleic Acids Research* **39**, 5215–5231 (2011).
67. Fabian, M. R. *et al.* Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Mol. Cell* **35**, 868–880 (2009).
68. Benne, R. & Hershey, J. W. The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *J. Biol. Chem.* **253**, 3078–3087 (1978).
69. Abramson, R. D. *et al.* The ATP-dependent interaction of eukaryotic initiation factors with mRNA. *J. Biol. Chem.* **262**, 3826–3832 (1987).
70. Ray, B. K. *et al.* ATP-dependent unwinding of messenger RNA structure by eukaryotic initiation factors. *J. Biol. Chem.* **260**, 7651–7658 (1985).
71. Méthot, N., Song, M. S. & Sonenberg, N. A region rich in aspartic acid, arginine, tyrosine, and glycine (DRYG) mediates eukaryotic initiation factor 4B (eIF4B) self-association and interaction with eIF3. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 5328–5334 (1996).
72. Bi, X. & Goss, D. J. Wheat germ poly(A)-binding protein increases the ATPase and the RNA helicase activity of translation initiation factors eIF4A, eIF4B, and eIF-iso4F. *J. Biol. Chem.* **275**, 17740–17746 (2000).
73. Bushell, M. *et al.* Disruption of the interaction of mammalian protein synthesis eukaryotic initiation factor 4B with the poly(A)-binding protein by caspase- and viral protease-mediated cleavages. *J. Biol. Chem.* **276**, 23922–23928 (2001).
74. Gingras, A. C., Raught, B. & Sonenberg, N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev.* **15**, 807–826 (2001).
75. Shahbazian, D. *et al.* Control of cell survival and proliferation by mammalian eukaryotic initiation factor 4B. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 1478–1485 (2010).
76. Dmitriev, S. E., Terenin, I. M., Dunaevsky, Y. E., Merrick, W. C. & Shatsky, I. N. Assembly of 48S translation initiation complexes from purified components with mRNAs that have some base pairing within their 5' untranslated regions. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 8925–8933 (2003).
77. Mengod, G. & Trachsel, H. Eukaryotic protein synthesis initiation factor eIF-3: determination of concentration and association with ribosomes in rabbit reticulocyte and HeLa cell lysates. *Biochim. Biophys. Acta* **825**, 169–174 (1985).
78. Siridechadilok, B., Fraser, C. S., Hall, R. J., Doudna, J. A. & Nogales, E. Structural roles for human translation factor eIF3 in initiation of protein synthesis. *Science* **310**, 1513–1515 (2005).
79. Asano, K., Phan, L., Anderson, J. & Hinnebusch, A. G. Complex formation by all five homologues of mammalian translation initiation factor 3 subunits from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**, 18573–18585 (1998).
80. Phan, L. *et al.* Identification of a translation initiation factor 3 (eIF3) core complex, conserved in yeast and mammals, that interacts with eIF5. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 4935–4946 (1998).
81. Akiyoshi, Y. *et al.* Fission yeast homolog of murine Int-6 protein, encoded by mouse mammary tumor virus integration site, is associated with the conserved core subunits of eukaryotic translation initiation factor 3. *J. Biol. Chem.* **276**, 10056–10062 (2001).



82. Crane, R. *et al.* A fission yeast homolog of Int-6, the mammalian oncoprotein and eIF3 subunit, induces drug resistance when overexpressed. *Mol. Biol. Cell* **11**, 3993–4003 (2000).
83. Passmore, L. A. *et al.* The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome. *Mol. Cell* **26**, 41–50 (2007).
84. Algire, M. A., Maag, D. & Lorsch, J. R. Pi release from eIF2, not GTP hydrolysis, is the step controlled by start-site selection during eukaryotic translation initiation. *Mol. Cell* **20**, 251–262 (2005).
85. Valásek, L. *et al.* The yeast eIF3 subunits TIF32/a, NIP1/c, and eIF5 make critical connections with the 40S ribosome in vivo. *Genes Dev.* **17**, 786–799 (2003).
86. Pestova, T. V. *et al.* The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* **403**, 332–335 (2000).
87. Kouba, T., Rutkai, E., Karásková, M. & Valásek, L. S. The eIF3c/NIP1 PCI domain interacts with RNA and RACK1/ASC1 and promotes assembly of translation preinitiation complexes. *Nucleic Acids Res.* **40**, 2683–2699 (2012).
88. Raught, B. *et al.* Serum-stimulated, rapamycin-sensitive phosphorylation sites in the eukaryotic translation initiation factor 4GI. *EMBO J.* **19**, 434–444 (2000).
89. Walsh, D. & Mohr, I. Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 860–875 (2011).
90. Donnelly, N., Gorman, A. M., Gupta, S. & Samali, A. The eIF2 $\alpha$  kinases: their structures and functions. *Cell. Mol. Life Sci.* (2013). doi:10.1007/s00018-012-1252-6
91. Garaigorta, U. & Chisari, F. V. Hepatitis C virus blocks interferon effector function by inducing protein kinase R phosphorylation. *Cell Host Microbe* **6**, 513–522 (2009).
92. Jan, E. & Sarnow, P. Factorless ribosome assembly on the internal ribosome entry site of cricket paralysis virus. *J. Mol. Biol.* **324**, 889–902 (2002).
93. Bonneau, A. M. & Sonenberg, N. Involvement of the 24-kDa cap-binding protein in regulation of protein synthesis in mitosis. *J. Biol. Chem.* **262**, 11134–11139 (1987).
94. Waskiewicz, A. J. *et al.* Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1871–1880 (1999).
95. Marcotrigiano, J., Gingras, A. C., Sonenberg, N. & Burley, S. K. Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Mol. Cell* **3**, 707–716 (1999).
96. Le Breton, M., Cormier, P., Bellé, R., Mulner-Lorillon, O. & Morales, J. Translational control during mitosis. *Biochimie* **87**, 805–811 (2005).
97. Gingras, A. C., Kennedy, S. G., O'Leary, M. A., Sonenberg, N. & Hay, N. 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev.* **12**, 502–513 (1998).
98. Salaün, P. *et al.* Embryonic-stage-dependent changes in the level of eIF4E-binding proteins during early development of sea urchin embryos. *J. Cell. Sci.* **118**, 1385–1394 (2005).
99. Gingras, A. C., Svitkin, Y., Belsham, G. J., Pause, A. & Sonenberg, N. Activation of the translational suppressor 4E-BP1 following infection with encephalomyocarditis virus and poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 5578–5583 (1996).
100. Craig, A. W., Haghighat, A., Yu, A. T. & Sonenberg, N. Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. *Nature* **392**, 520–523 (1998).
101. Martineau, Y. *et al.* Poly(A)-binding protein-interacting protein 1 binds to eukaryotic translation initiation factor 3 to stimulate translation. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 6658–6667 (2008).
102. Rabl, J., Leibundgut, M., Ataide, S. F., Haag, A. & Ban, N. Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1. *Science* **331**, 730–736 (2011).
103. Kondrashov, N. *et al.* Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell* **145**, 383–397 (2011).

104. Hertz, M. I., Landry, D. M., Willis, A. E., Luo, G. & Thompson, S. R. Ribosomal protein S25 dependency reveals a common mechanism for diverse internal ribosome entry sites and ribosome shunting. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 1016–1026 (2013).
105. Landry, D. M., Hertz, M. I. & Thompson, S. R. RPS25 is essential for translation initiation by the Dicistroviridae and hepatitis C viral IRESs. *Genes Dev.* **23**, 2753–2764 (2009).
106. Nguyen-Lefebvre, A. T. *et al.* V-erbA generates ribosomes devoid of RPL11 and regulates translational activity in avian erythroid progenitors. *Oncogene* (2013). doi:10.1038/onc.2013.93
107. Parrish, S. & Moss, B. Characterization of a second vaccinia virus mRNA-decapping enzyme conserved in poxviruses. *J. Virol.* **81**, 12973–12978 (2007).
108. Lloyd, R. E. Translational control by viral proteinases. *Virus Res.* **119**, 76–88 (2006).
109. Spriggs, K. A., Stoneley, M., Bushell, M. & Willis, A. E. Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. *Biol. Cell* **100**, 27–38 (2008).
110. Nanbru, C. *et al.* Alternative translation of the proto-oncogene c-myc by an internal ribosome entry site. *J. Biol. Chem.* **272**, 32061–32066 (1997).
111. Chappell, S. A. *et al.* A mutation in the c-myc-IRES leads to enhanced internal ribosome entry in multiple myeloma: a novel mechanism of oncogene de-regulation. *Oncogene* **19**, 4437–4440 (2000).
112. Hernández, G., Vázquez-Pianzola, P., Sierra, J. M. & Rivera-Pomar, R. Internal ribosome entry site drives cap-independent translation of reaper and heat shock protein 70 mRNAs in *Drosophila* embryos. *RNA* **10**, 1783–1797 (2004).
113. Jang, S. K. *et al.* A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J. Virol.* **62**, 2636–2643 (1988).
114. Pelletier, J. & Sonenberg, N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* **334**, 320–325 (1988).
115. Nomoto, A., Lee, Y. F. & Wimmer, E. The 5' end of poliovirus mRNA is not capped with m7G(5')ppp(5')Np. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 375–380 (1976).
116. Balvay, L., Soto Rifo, R., Ricci, E. P., Decimo, D. & Ohlmann, T. Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim. Biophys. Acta* **1789**, 542–557 (2009).
117. Pestova, T. V., Borukhov, S. I. & Hellen, C. U. Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* **394**, 854–859 (1998).
118. Wilson, J. E., Powell, M. J., Hoover, S. E. & Sarnow, P. Naturally occurring dicistronic cricket paralysis virus RNA is regulated by two internal ribosome entry sites. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4990–4999 (2000).
119. Herbreteau, C. H. *et al.* HIV-2 genomic RNA contains a novel type of IRES located downstream of its initiation codon. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 1001–1007 (2005).
120. Roberts, L. O., Seamons, R. A. & Belsham, G. J. Recognition of picornavirus internal ribosome entry sites within cells; influence of cellular and viral proteins. *RNA* **4**, 520–529 (1998).
121. Stoneley, M. *et al.* Analysis of the c-myc IRES; a potential role for cell-type specific trans-acting factors and the nuclear compartment. *Nucleic Acids Res.* **28**, 687–694 (2000).
122. Vallejos, M. *et al.* Activity of the human immunodeficiency virus type 1 cell cycle-dependent internal ribosomal entry site is modulated by IRES trans-acting factors. *Nucleic Acids Res.* **39**, 6186–6200 (2011).
123. Bushell, M. *et al.* Polypyrimidine tract binding protein regulates IRES-mediated gene expression during apoptosis. *Mol. Cell* **23**, 401–412 (2006).
124. Cobbold, L. C. *et al.* Identification of internal ribosome entry segment (IRES)-trans-acting factors for the Myc family of IRESs. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 40–49 (2008).
125. Mitchell, S. A., Spriggs, K. A., Coldwell, M. J., Jackson, R. J. & Willis, A. E. The Apaf-1 internal ribosome entry segment attains the correct structural conformation for function via interactions with PTB and unr. *Mol. Cell* **11**, 757–771 (2003).

126. Lowen, A. C. & Palese, P. Influenza virus transmission: basic science and implications for the use of antiviral drugs during a pandemic. *Infect Disord Drug Targets* **7**, 318–328 (2007).
127. Taubenberger, J. K. The origin and virulence of the 1918 'Spanish' influenza virus. *Proc Am Philos Soc* **150**, 86–112 (2006).
128. Shope, R. E. THE INFECTION OF FERRETS WITH SWINE INFLUENZA VIRUS. *J. Exp. Med.* **60**, 49–61 (1934).
129. Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M. & Kawaoka, Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* **56**, 152–179 (1992).
130. Fouchier, R., Kuiken, T., Rimmelzwaan, G. & Osterhaus, A. Global task force for influenza. *Nature* **435**, 419–420 (2005).
131. Zhu, X. *et al.* Hemagglutinin homologue from H17N10 bat influenza virus exhibits divergent receptor-binding and pH-dependent fusion activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 1458–1463 (2013).
132. Johnson, N. P. A. S. & Mueller, J. Updating the accounts: global mortality of the 1918–1920 'Spanish' influenza pandemic. *Bull Hist Med* **76**, 105–115 (2002).
133. Smith, G. J. D. *et al.* Dating the emergence of pandemic influenza viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 11709–11712 (2009).
134. Nguyen, A. M. & Noymer, A. Influenza mortality in the United States, 2009 pandemic: burden, timing and age distribution. *PLoS ONE* **8**, e64198 (2013).
135. Drake, J. W. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 4171–4175 (1993).
136. Carrat, F. & Flahault, A. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine* **25**, 6852–6862 (2007).
137. Ferguson, N. M., Galvani, A. P. & Bush, R. M. Ecological and immunological determinants of influenza evolution. *Nature* **422**, 428–433 (2003).
138. Saitou, N. & Nei, M. Polymorphism and evolution of influenza A virus genes. *Mol. Biol. Evol.* **3**, 57–74 (1986).
139. Magill, T. P. & Francis, T. STUDIES WITH HUMAN INFLUENZA VIRUS CULTIVATED IN ARTIFICIAL MEDIUM. *J. Exp. Med.* **63**, 803–811 (1936).
140. Koudstaal, W. *et al.* Pre- and postexposure use of human monoclonal antibody against H5N1 and H1N1 influenza virus in mice: viable alternative to oseltamivir. *J. Infect. Dis.* **200**, 1870–1873 (2009).
141. Nicolson, C., Major, D., Wood, J. M. & Robertson, J. S. Generation of influenza vaccine viruses on Vero cells by reverse genetics: an H5N1 candidate vaccine strain produced under a quality system. *Vaccine* **23**, 2943–2952 (2005).
142. Welsh, J. P., Lu, Y., He, X.-S., Greenberg, H. B. & Swartz, J. R. Cell-free production of trimeric influenza hemagglutinin head domain proteins as vaccine antigens. *Biotechnol. Bioeng.* **109**, 2962–2969 (2012).
143. Minor, P. D. Polio eradication, cessation of vaccination and re-emergence of disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 473–482 (2004).
144. Watowich, S. J., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. Crystal structures of influenza virus hemagglutinin in complex with high-affinity receptor analogs. *Structure* **2**, 719–731 (1994).
145. Seto, J. T. & Rott, R. Functional significance of sialidase during influenza virus multiplication. *Virology* **30**, 731–737 (1966).
146. Wagner, R., Matrosovich, M. & Klenk, H.-D. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev. Med. Virol.* **12**, 159–166 (2002).
147. Ye, Z., Liu, T., Offringa, D. P., McInnis, J. & Levandowski, R. A. Association of influenza virus matrix protein with ribonucleoproteins. *J. Virol.* **73**, 7467–7473 (1999).
148. Sugrue, R. J. & Hay, A. J. Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. *Virology* **180**, 617–624 (1991).
149. Pinto, L. H., Holsinger, L. J. & Lamb, R. A. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* **69**, 517–528 (1992).

150. Nguyen, P. A. *et al.* pH-induced conformational change of the influenza M2 protein C-terminal domain. *Biochemistry* **47**, 9934–9936 (2008).
151. Compans, R. W. Hemagglutination-inhibition: rapid assay for neuraminic acid-containing viruses. *J. Virol.* **14**, 1307–1309 (1974).
152. Noda, T. *et al.* Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* **439**, 490–492 (2006).
153. Richardson, J. C. & Akkina, R. K. NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. *Arch. Virol.* **116**, 69–80 (1991).
154. Katze, M. G. & Krug, R. M. Metabolism and expression of RNA polymerase II transcripts in influenza virus-infected cells. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 2198–2206 (1984).
155. Rust, M. J., Lakadamyali, M., Zhang, F. & Zhuang, X. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 567–573 (2004).
156. Stegmann, T. Membrane fusion mechanisms: the influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion. *Traffic* **1**, 598–604 (2000).
157. O'Neill, R. E., Jaskunas, R., Blobel, G., Palese, P. & Moroianu, J. Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *J. Biol. Chem.* **270**, 22701–22704 (1995).
158. Cros, J. F., García-Sastre, A. & Palese, P. An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. *Traffic* **6**, 205–213 (2005).
159. Dias, A. *et al.* The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* **458**, 914–918 (2009).
160. Caton, A. J. & Robertson, J. S. Structure of the host-derived sequences present at the 5' ends of influenza virus mRNA. *Nucleic Acids Res.* **8**, 2591–2603 (1980).
161. Robertson, H. D., Dickson, E., Plotch, S. J. & Krug, R. M. Identification of the RNA region transferred from a representative primer, beta-globin mRNA, to influenza mRNA during in vitro transcription. *Nucleic Acids Res.* **8**, 925–942 (1980).
162. Zheng, H., Lee, H. A., Palese, P. & García-Sastre, A. Influenza A virus RNA polymerase has the ability to stutter at the polyadenylation site of a viral RNA template during RNA replication. *J. Virol.* **73**, 5240–5243 (1999).
163. Hay, A. J., Abraham, G., Skehel, J. J., Smith, J. C. & Fellner, P. Influenza virus messenger RNAs are incomplete transcripts of the genome RNAs. *Nucleic Acids Res.* **4**, 4197–4209 (1977).
164. Poon, L. L., Pritlove, D. C., Sharps, J. & Brownlee, G. G. The RNA polymerase of influenza virus, bound to the 5' end of virion RNA, acts in cis to polyadenylate mRNA. *J. Virol.* **72**, 8214–8219 (1998).
165. Pritlove, D. C., Poon, L. L., Devenish, L. J., Leahy, M. B. & Brownlee, G. G. A hairpin loop at the 5' end of influenza A virus virion RNA is required for synthesis of poly(A)<sup>+</sup> mRNA in vitro. *J. Virol.* **73**, 2109–2114 (1999).
166. Lamb, R. A. & Lai, C. J. Spliced and unspliced messenger RNAs synthesized from cloned influenza virus M DNA in an SV40 vector: expression of the influenza virus membrane protein (M1). *Virology* **123**, 237–256 (1982).
167. Lamb, R. A. & Lai, C. J. Expression of unspliced NS1 mRNA, spliced NS2 mRNA, and a spliced chimera mRNA from cloned influenza virus NS DNA in an SV40 vector. *Virology* **135**, 139–147 (1984).
168. Fodor, E., Pritlove, D. C. & Brownlee, G. G. The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription. *J. Virol.* **68**, 4092–4096 (1994).
169. Fodor, E., Pritlove, D. C. & Brownlee, G. G. Characterization of the RNA-fork model of virion RNA in the initiation of transcription in influenza A virus. *J. Virol.* **69**, 4012–4019 (1995).
170. Smith, G. L. & Hay, A. J. Replication of the influenza virus genome. *Virology* **118**, 96–108 (1982).
171. Yamanaka, K., Ishihama, A. & Nagata, K. Translational regulation of influenza virus mRNAs. *Virus Genes* **2**, 19–30 (1988).



172. Yamanaka, K., Nagata, K. & Ishihama, A. Temporal control for translation of influenza virus mRNAs. *Arch. Virol.* **120**, 33–42 (1991).
173. Hatada, E., Hasegawa, M., Mukaigawa, J., Shimizu, K. & Fukuda, R. Control of influenza virus gene expression: quantitative analysis of each viral RNA species in infected cells. *J. Biochem.* **105**, 537–546 (1989).
174. Enami, M., Fukuda, R. & Ishihama, A. Transcription and replication of eight RNA segments of influenza virus. *Virology* **142**, 68–77 (1985).
175. Vester, D. *et al.* Real-time RT-qPCR assay for the analysis of human influenza A virus transcription and replication dynamics. *J. Virol. Methods* **168**, 63–71 (2010).
176. Schroeder, C., Heider, H., Möncke-Buchner, E. & Lin, T.-I. The influenza virus ion channel and maturation cofactor M2 is a cholesterol-binding protein. *Eur. Biophys. J.* **34**, 52–66 (2005).
177. Whittaker, G., Bui, M. & Helenius, A. Nuclear trafficking of influenza virus ribonucleoproteins in heterokaryons. *J. Virol.* **70**, 2743–2756 (1996).
178. Elton, D. *et al.* Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J. Virol.* **75**, 408–419 (2001).
179. Digard, P. *et al.* Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments. *J. Virol.* **73**, 2222–2231 (1999).
180. Scholtissek, C., Stech, J., Krauss, S. & Webster, R. G. Cooperation between the hemagglutinin of avian viruses and the matrix protein of human influenza A viruses. *J. Virol.* **76**, 1781–1786 (2002).
181. Enami, M., Sharma, G., Benham, C. & Palese, P. An influenza virus containing nine different RNA segments. *Virology* **185**, 291–298 (1991).
182. Almond, J. W., McGeoch, D. & Barry, R. D. Method for assigning temperature-sensitive mutations of influenza viruses to individual segments of the genome. *Virology* **81**, 62–73 (1977).
183. Bergmann, M. & Muster, T. The relative amount of an influenza A virus segment present in the viral particle is not affected by a reduction in replication of that segment. *J. Gen. Virol.* **76** ( Pt 12), 3211–3215 (1995).
184. Fujii, Y., Goto, H., Watanabe, T., Yoshida, T. & Kawaoka, Y. Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 2002–2007 (2003).
185. Fujii, K. *et al.* Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. *J. Virol.* **79**, 3766–3774 (2005).
186. Ozawa, M. *et al.* Nucleotide sequence requirements at the 5' end of the influenza A virus M RNA segment for efficient virus replication. *J. Virol.* **83**, 3384–3388 (2009).
187. Liang, Y., Hong, Y. & Parslow, T. G. cis-Acting packaging signals in the influenza virus PB1, PB2, and PA genomic RNA segments. *J. Virol.* **79**, 10348–10355 (2005).
188. Randall, R. E. & Goodbourn, S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* **89**, 1–47 (2008).
189. Hale, B. G., Randall, R. E., Ortín, J. & Jackson, D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* **89**, 2359–2376 (2008).
190. Marcus, P. I. Interferon induction by viruses: one molecule of dsRNA as the threshold for interferon induction. *Interferon* **5**, 115–180 (1983).
191. García, M. A. *et al.* Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 1032–1060 (2006).
192. Grimm, D. *et al.* Replication fitness determines high virulence of influenza A virus in mice carrying functional Mx1 resistance gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 6806–6811 (2007).
193. Kurokawa, M., Watanabe, W., Shimizu, T., Sawamura, R. & Shiraki, K. Modulation of cytokine production by 7-hydroxycoumarin in vitro and its efficacy against influenza infection in mice. *Antiviral Res.* **85**, 373–380 (2010).

194. Mazur, I. *et al.* The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cell. Microbiol.* **10**, 1140–1152 (2008).
195. Engelhardt, O. G., Smith, M. & Fodor, E. Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *J. Virol.* **79**, 5812–5818 (2005).
196. Nemeroff, M. E., Barabino, S. M., Li, Y., Keller, W. & Krug, R. M. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs. *Mol. Cell* **1**, 991–1000 (1998).
197. Chen, Z., Li, Y. & Krug, R. M. Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *EMBO J.* **18**, 2273–2283 (1999).
198. Desmet, E. A., Bussey, K. A., Stone, R. & Takimoto, T. Identification of the N-terminal domain of the influenza virus PA responsible for the suppression of host protein synthesis. *J. Virol.* **87**, 3108–3118 (2013).
199. Hinshaw, V. S., Olsen, C. W., Dybdahl-Sissoko, N. & Evans, D. Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses. *J. Virol.* **68**, 3667–3673 (1994).
200. Takizawa, T. *et al.* Induction of programmed cell death (apoptosis) by influenza virus infection in tissue culture cells. *J. Gen. Virol.* **74** ( Pt 11), 2347–2355 (1993).
201. Balachandran, S. *et al.* Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. *Immunity* **13**, 129–141 (2000).
202. Wada, N. *et al.* Transcription stimulation of the Fas-encoding gene by nuclear factor for interleukin-6 expression upon influenza virus infection. *J. Biol. Chem.* **270**, 18007–18012 (1995).
203. Lin, C. *et al.* The involvement of a stress-activated pathway in equine influenza virus-mediated apoptosis. *Virology* **287**, 202–213 (2001).
204. Oh, S., McCaffery, J. M. & Eichelberger, M. C. Dose-dependent changes in influenza virus-infected dendritic cells result in increased allogeneic T-cell proliferation at low, but not high, doses of virus. *J. Virol.* **74**, 5460–5469 (2000).
205. Zamarin, D., García-Sastre, A., Xiao, X., Wang, R. & Palese, P. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog.* **1**, e4 (2005).
206. Smith, A. M. *et al.* Effect of 1918 PB1-F2 expression on influenza A virus infection kinetics. *PLoS Comput. Biol.* **7**, e1001081 (2011).
207. Chen, W. *et al.* A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat. Med.* **7**, 1306–1312 (2001).
208. Wang, L. & Lee, C.-W. Sequencing and mutational analysis of the non-coding regions of influenza A virus. *Vet. Microbiol.* **135**, 239–247 (2009).
209. Szymkowiak, C. *et al.* Rapid method for the characterization of 3' and 5' UTRs of influenza viruses. *J. Virol. Methods* **107**, 15–20 (2003).
210. de Wit, E. *et al.* Rapid sequencing of the non-coding regions of influenza A virus. *J. Virol. Methods* **139**, 85–89 (2007).
211. Robertson, J. S. 5' and 3' terminal nucleotide sequences of the RNA genome segments of influenza virus. *Nucleic Acids Res.* **6**, 3745–3757 (1979).
212. Furuse, Y. & Oshitani, H. Evolution of the influenza A virus untranslated regions. *Infect. Genet. Evol.* **11**, 1150–1154 (2011).
213. Flick, R., Neumann, G., Hoffmann, E., Neumeier, E. & Hobom, G. Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure. *RNA* **2**, 1046–1057 (1996).
214. Hagen, M., Chung, T. D., Butcher, J. A. & Krystal, M. Recombinant influenza virus polymerase: requirement of both 5' and 3' viral ends for endonuclease activity. *J. Virol.* **68**, 1509–1515 (1994).
215. Kim, H. J., Fodor, E., Brownlee, G. G. & Seong, B. L. Mutational analysis of the RNA-fork model of the influenza A virus vRNA promoter in vivo. *J. Gen. Virol.* **78** ( Pt 2), 353–357 (1997).

216. Zheng, H., Palese, P. & García-Sastre, A. Nonconserved nucleotides at the 3' and 5' ends of an influenza A virus RNA play an important role in viral RNA replication. *Virology* **217**, 242–251 (1996).
217. Beaton, A. R. & Krug, R. M. Selected host cell capped RNA fragments prime influenza viral RNA transcription in vivo. *Nucleic Acids Res.* **9**, 4423–4436 (1981).
218. Li, X. & Palese, P. Characterization of the polyadenylation signal of influenza virus RNA. *J. Virol.* **68**, 1245–1249 (1994).
219. Wang, W. *et al.* RNA binding by the novel helical domain of the influenza virus NS1 protein requires its dimer structure and a small number of specific basic amino acids. *RNA* **5**, 195–205 (1999).
220. Krug, R. M. & Etkind, P. R. Cytoplasmic and nuclear virus-specific proteins in influenza virus-infected MDCK cells. *Virology* **56**, 334–348 (1973).
221. Egorov, A. *et al.* Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. *J. Virol.* **72**, 6437–6441 (1998).
222. García-Sastre, A. *et al.* Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* **252**, 324–330 (1998).
223. Kochs, G., García-Sastre, A. & Martínez-Sobrido, L. Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. *J. Virol.* **81**, 7011–7021 (2007).
224. Inglis, S. C., Barrett, T., Brown, C. M. & Almond, J. W. The smallest genome RNA segment of influenza virus contains two genes that may overlap. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 3790–3794 (1979).
225. Hatada, E. & Fukuda, R. Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro. *J. Gen. Virol.* **73** ( Pt 12), 3325–3329 (1992).
226. Wang, W. & Krug, R. M. The RNA-binding and effector domains of the viral NS1 protein are conserved to different extents among influenza A and B viruses. *Virology* **223**, 41–50 (1996).
227. Nemeroff, M. E., Qian, X. Y. & Krug, R. M. The influenza virus NS1 protein forms multimers in vitro and in vivo. *Virology* **212**, 422–428 (1995).
228. Chien, C. *et al.* Biophysical characterization of the complex between double-stranded RNA and the N-terminal domain of the NS1 protein from influenza A virus: evidence for a novel RNA-binding mode. *Biochemistry* **43**, 1950–1962 (2004).
229. Krug, R. M., Yuan, W., Noah, D. L. & Latham, A. G. Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein. *Virology* **309**, 181–189 (2003).
230. Fortes, P., Beloso, A. & Ortín, J. Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport. *EMBO J.* **13**, 704–712 (1994).
231. Aragón, T. *et al.* Eukaryotic translation initiation factor 4G1 is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6259–6268 (2000).
232. Falcón, A. M., Fortes, P., Marión, R. M., Beloso, A. & Ortín, J. Interaction of influenza virus NS1 protein and the human homologue of Staufen in vivo and in vitro. *Nucleic Acids Res.* **27**, 2241–2247 (1999).
233. Li, S., Min, J.-Y., Krug, R. M. & Sen, G. C. Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA. *Virology* **349**, 13–21 (2006).
234. Garaigorta, U. & Ortín, J. Mutation analysis of a recombinant NS replicon shows that influenza virus NS1 protein blocks the splicing and nucleo-cytoplasmic transport of its own viral mRNA. *Nucleic Acids Res.* **35**, 4573–4582 (2007).
235. Wolstenholme, A. J., Barrett, T., Nichol, S. T. & Mahy, B. W. Influenza virus-specific RNA and protein syntheses in cells infected with temperature-sensitive mutants defective in the genome segment encoding nonstructural proteins. *J. Virol.* **35**, 1–7 (1980).
236. Falcón, A. M. *et al.* Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive influenza viruses expressing deleted forms of the NS1 protein. *J. Virol.* **78**, 3880–3888 (2004).

237. Marión, R. M., Zürcher, T., de la Luna, S. & Ortín, J. Influenza virus NS1 protein interacts with viral transcription-replication complexes in vivo. *J. Gen. Virol.* **78** ( Pt 10), 2447–2451 (1997).
238. Twu, K. Y., Kuo, R.-L., Marklund, J. & Krug, R. M. The H5N1 influenza virus NS genes selected after 1998 enhance virus replication in mammalian cells. *J. Virol.* **81**, 8112–8121 (2007).
239. Satterly, N. *et al.* Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 1853–1858 (2007).
240. Talon, J. *et al.* Influenza A and B viruses expressing altered NS1 proteins: A vaccine approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 4309–4314 (2000).
241. Tan, S. L. & Katze, M. G. Biochemical and genetic evidence for complex formation between the influenza A virus NS1 protein and the interferon-induced PKR protein kinase. *J. Interferon Cytokine Res.* **18**, 757–766 (1998).
242. Khaperskyy, D. A., Hatchette, T. F. & McCormick, C. Influenza A virus inhibits cytoplasmic stress granule formation. *FASEB J.* **26**, 1629–1639 (2012).
243. Terrier, O. *et al.* The influenza fingerprints: NS1 and M1 proteins contribute to specific host cell ultrastructure signatures upon infection by different influenza A viruses. *Virology* **432**, 204–218 (2012).
244. Compans, R. W. & Dimmock, N. J. An electron microscopic study of single-cycle infection of chick embryo fibroblasts by influenza virus. *Virology* **39**, 499–515 (1969).
245. Kopp, J. V., Kempf, J. E. & Kroeger, A. V. Cytoplasmic inclusions observed by electron microscopy late in influenza virus infection of chicken embryo fibroblasts. *Virology* **36**, 681–683 (1968).
246. Garfinkel, M. S. & Katze, M. G. Translational control by influenza virus. Selective and cap-dependent translation of viral mRNAs in infected cells. *J. Biol. Chem.* **267**, 9383–9390 (1992).
247. Feigenblum, D. & Schneider, R. J. Modification of eukaryotic initiation factor 4F during infection by influenza virus. *J. Virol.* **67**, 3027–3035 (1993).
248. Wise, H. M. *et al.* Overlapping signals for translational regulation and packaging of influenza A virus segment 2. *Nucleic Acids Res.* **39**, 7775–7790 (2011).
249. Garfinkel, M. S. & Katze, M. G. Translational control by influenza virus. Selective translation is mediated by sequences within the viral mRNA 5'-untranslated region. *J. Biol. Chem.* **268**, 22223–22226 (1993).
250. Cassetti, M. C., Noah, D. L., Montelione, G. T. & Krug, R. M. Efficient translation of mRNAs in influenza A virus-infected cells is independent of the viral 5' untranslated region. *Virology* **289**, 180–185 (2001).
251. Yáñez, E. *et al.* Functional impairment of eIF4A and eIF4G factors correlates with inhibition of influenza virus mRNA translation. *Virology* **413**, 93–102 (2011).
252. Yáñez, E., Rodríguez, P., Goodfellow, I. & Nieto, A. Influenza virus polymerase confers independence of the cellular cap-binding factor eIF4E for viral mRNA translation. *Virology* **422**, 297–307 (2012).
253. Burgui, I., Yáñez, E., Sonenberg, N. & Nieto, A. Influenza virus mRNA translation revisited: is the eIF4E cap-binding factor required for viral mRNA translation? *J. Virol.* **81**, 12427–12438 (2007).
254. Qian, Z. & Wilusz, J. GRSF-1: a poly(A)<sup>+</sup> mRNA binding protein which interacts with a conserved G-rich element. *Nucleic Acids Res.* **22**, 2334–2343 (1994).
255. Park, Y. W. & Katze, M. G. Translational control by influenza virus. Identification of cis-acting sequences and trans-acting factors which may regulate selective viral mRNA translation. *J. Biol. Chem.* **270**, 28433–28439 (1995).
256. Park, Y. W., Wilusz, J. & Katze, M. G. Regulation of eukaryotic protein synthesis: selective influenza viral mRNA translation is mediated by the cellular RNA-binding protein GRSF-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 6694–6699 (1999).
257. Kash, J. C. *et al.* Selective translation of eukaryotic mRNAs: functional molecular analysis of GRSF-1, a positive regulator of influenza virus protein synthesis. *J. Virol.* **76**, 10417–10426 (2002).



258. Kash, J. C., Goodman, A. G., Korth, M. J. & Katze, M. G. Hijacking of the host-cell response and translational control during influenza virus infection. *Virus Res.* **119**, 111–120 (2006).
259. Yángüez, E. & Nieto, A. So similar, yet so different: selective translation of capped and polyadenylated viral mRNAs in the influenza virus infected cell. *Virus Res.* **156**, 1–12 (2011).
260. Bier, K., York, A. & Fodor, E. Cellular cap-binding proteins associate with influenza virus mRNAs. *J. Gen. Virol.* **92**, 1627–1634 (2011).
261. Burgui, I., Aragón, T., Ortín, J. & Nieto, A. PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J. Gen. Virol.* **84**, 3263–3274 (2003).
262. Enami, K., Sato, T. A., Nakada, S. & Enami, M. Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein. *J. Virol.* **68**, 1432–1437 (1994).
263. de la Luna, S., Fortes, P., Beloso, A. & Ortín, J. Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. *J. Virol.* **69**, 2427–2433 (1995).
264. Kainov, D. E. *et al.* Differential effects of NS1 proteins of human pandemic H1N1/2009, avian highly pathogenic H5N1, and low pathogenic H5N2 influenza A viruses on cellular pre-mRNA polyadenylation and mRNA translation. *J. Biol. Chem.* **286**, 7239–7247 (2011).
265. NIRENBERG, M. W. & MATTHAEI, J. H. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **47**, 1588–1602 (1961).
266. LEDER, P., CLARK, B. F., SLY, W. S., PESTKA, S. & NIRENBERG, M. W. CELL-FREE PEPTIDE SYNTHESIS DEPENDENT UPON SYNTHETIC OLIGODEOXYNUCLEOTIDES. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **50**, 1135–1143 (1963).
267. FALASCHI, A., ADLER, J. & KHORANA, H. G. CHEMICALLY SYNTHESIZED DEOXYPOLYNUCLEOTIDES AS TEMPLATES FOR RIBONUCLEIC ACID POLYMERASE. *J. Biol. Chem.* **238**, 3080–3085 (1963).
268. Roberts, B. E. & Paterson, B. M. Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **70**, 2330–2334 (1973).
269. Legon, S., Jackson, R. J. & Hunt, T. Control of protein synthesis in reticulocyte lysates by haemin. *Nature New Biol.* **241**, 150–152 (1973).
270. Roberts, J. H., Stard, P., Giri, C. P. & Smulson, M. Cytoplasmic poly(ADP-ribose) polymerase during the HeLa cell cycle. *Arch. Biochem. Biophys.* **171**, 305–315 (1975).
271. Zubay, G., Lederman, M. & DeVries, J. K. DNA-directed peptide synthesis. 3. Repression of beta-galactosidase synthesis and inhibition of repressor by inducer in a cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **58**, 1669–1675 (1967).
272. Spirin, A. S., Baranov, V. I., Ryabova, L. A., Ovodov, S. Y. & Alakhov, Y. B. A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science* **242**, 1162–1164 (1988).
273. Kigawa, T. & Yokoyama, S. A continuous cell-free protein synthesis system for coupled transcription-translation. *J. Biochem.* **110**, 166–168 (1991).
274. Long, J. C. & Caceres, J. F. The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem. J.* **417**, 15–27 (2009).
275. Sivendran, S. *et al.* Metabolic complications with the use of mTOR inhibitors for cancer therapy. *Cancer Treat. Rev.* (2013). doi:10.1016/j.ctrv.2013.04.005
276. Wu, M. *et al.* Method for Electric Parametric Characterization and Optimization of Electroporation on a Chip. *Anal. Chem.* (2013). doi:10.1021/ac400017x
277. Krieg, P. A. & Melton, D. A. Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs. *Nucleic Acids Res.* **12**, 7057–7070 (1984).
278. Spirin, A. S. High-throughput cell-free systems for synthesis of functionally active proteins. *Trends Biotechnol.* **22**, 538–545 (2004).
279. Nirenberg, M. Historical review: Deciphering the genetic code--a personal account. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 46–54 (2004).

280. Carlson, E. D., Gan, R., Hodgman, C. E. & Jewett, M. C. Cell-free protein synthesis: applications come of age. *Biotechnol. Adv.* **30**, 1185–1194 (2012).
281. Zawada, J. F. Preparation and testing of E. coli S30 in vitro transcription translation extracts. *Methods Mol. Biol.* **805**, 31–41 (2012).
282. Endo, Y. & Sawasaki, T. High-throughput, genome-scale protein production method based on the wheat germ cell-free expression system. *Biotechnol. Adv.* **21**, 695–713 (2003).
283. Endo, Y. & Sawasaki, T. Cell-free expression systems for eukaryotic protein production. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**, 373–380 (2006).
284. Takai, K., Sawasaki, T. & Endo, Y. Practical cell-free protein synthesis system using purified wheat embryos. *Nat Protoc* **5**, 227–238 (2010).
285. Madin, K., Sawasaki, T., Ogasawara, T. & Endo, Y. A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 559–564 (2000).
286. Croci, S., Pedrazzi, G., Passeri, G., Piccolo, P. & Ortalli, I. Acetylphenylhydrazine induced haemoglobin oxidation in erythrocytes studied by Mössbauer spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1568**, 99–104 (2001).
287. Tarui, H. *et al.* Establishment and characterization of cell-free translation/glycosylation in insect cell (*Spodoptera frugiperda* 21) extract prepared with high pressure treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 446–453 (2001).
288. Shields, D. & Blobel, G. Efficient cleavage and segregation of nascent presecretory proteins in a reticulocyte lysate supplemented with microsomal membranes. *J. Biol. Chem.* **253**, 3753–3756 (1978).
289. Safer, B. & Jagus, R. Control of eIF-2 phosphatase activity in rabbit reticulocyte lysate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 1094–1098 (1979).
290. Gibbs, P. E., Zouzias, D. C. & Freedberg, I. M. Differential post-translational modification of human type I keratins synthesized in a rabbit reticulocyte cell-free system. *Biochim. Biophys. Acta* **824**, 247–255 (1985).
291. Hancock, J. F. Reticulocyte lysate assay for in vitro translation and posttranslational modification of Ras proteins. *Meth. Enzymol.* **255**, 60–65 (1995).
292. Tahara, S. M. *et al.* Effect of hemin on site-specific phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 789–793 (1978).
293. Soto Rifo, R., Ricci, E. P., Décimo, D., Moncorgé, O. & Ohlmann, T. Back to basics: the untreated rabbit reticulocyte lysate as a competitive system to recapitulate cap/poly(A) synergy and the selective advantage of IRES-driven translation. *Nucleic Acids Res.* **35**, e121 (2007).
294. Weber, L. A., Feman, E. R. & Baglioni, C. A cell free system from HeLa cells active in initiation of protein synthesis. *Biochemistry* **14**, 5315–5321 (1975).
295. Mikami, S., Kobayashi, T., Masutani, M., Yokoyama, S. & Imataka, H. A human cell-derived in vitro coupled transcription/translation system optimized for production of recombinant proteins. *Protein Expr. Purif.* **62**, 190–198 (2008).
296. Yadavalli, R., Ledger, C. & Sam-Yellowe, T. Y. In vitro human cell-free expression system for synthesis of malaria proteins. *Parasitol. Res.* **111**, 2461–2465 (2012).
297. Sakurai, N. *et al.* Detection of co- and posttranslational protein N-myristoylation by metabolic labeling in an insect cell-free protein synthesis system. *Anal. Biochem.* **362**, 236–244 (2007).
298. Suzuki, T. *et al.* Protein prenylation in an insect cell-free protein synthesis system and identification of products by mass spectrometry. *Proteomics* **7**, 1942–1950 (2007).
299. Wang, X. *et al.* An optimized yeast cell-free system: sufficient for translation of human papillomavirus 58 L1 mRNA and assembly of virus-like particles. *J. Biosci. Bioeng.* **106**, 8–15 (2008).
300. Svitkin, Y. V. *et al.* Towards development of an in vitro translation test for poliovirus neurovirulence. *Dev. Biol. Stand.* **78**, 27–32 (1993).

301. Ricci, E. P. *et al.* In vitro expression of the HIV-2 genomic RNA is controlled by three distinct internal ribosome entry segments that are regulated by the HIV protease and the Gag polyprotein. *Rna* **14**, 1443–1455 (2008).
302. Weill, L. *et al.* A new type of IRES within gag coding region recruits three initiation complexes on HIV-2 genomic RNA. *Nucleic Acids Res.* **38**, 1367–1381 (2010).
303. Ricci, E. P. *et al.* miRNA repression of translation in vitro takes place during 43S ribosomal scanning. *Nucleic Acids Res.* **41**, 586–598 (2013).
304. Novac, O., Guenier, A.-S. & Pelletier, J. Inhibitors of protein synthesis identified by a high throughput multiplexed translation screen. *Nucleic Acids Res.* **32**, 902–915 (2004).
305. Schneider-Poetsch, T. *et al.* Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 209–217 (2010).
306. Mochizuki, Y., Kohno, F., Nishigaki, K. & Nemoto, N. A pull-down method with a biotinylated bait protein prepared by cell-free translation using a puromycin linker. *Anal. Biochem.* **434**, 93–95 (2013).
307. Sawasaki, T., Ogasawara, T., Morishita, R. & Endo, Y. A cell-free protein synthesis system for high-throughput proteomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 14652–14657 (2002).
308. Montelione, G. T., Zheng, D., Huang, Y. J., Gunsalus, K. C. & Szyperski, T. Protein NMR spectroscopy in structural genomics. *Nat. Struct. Biol.* **7 Suppl**, 982–985 (2000).
309. Klammt, C. *et al.* Cell-free expression as an emerging technique for the large scale production of integral membrane protein. *FEBS J.* **273**, 4141–4153 (2006).
310. Raman, P., Cherezov, V. & Caffrey, M. The Membrane Protein Data Bank. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 36–51 (2006).
311. Ishihara, G. *et al.* Expression of G protein coupled receptors in a cell-free translational system using detergents and thioredoxin-fusion vectors. *Protein Expr. Purif.* **41**, 27–37 (2005).
312. Tsuboi, T. *et al.* Wheat germ cell-free system-based production of malaria proteins for discovery of novel vaccine candidates. *Infect. Immun.* **76**, 1702–1708 (2008).
313. Zichel, R. *et al.* Efficacy of a potential trivalent vaccine based on Hc fragments of botulinum toxins A, B, and E produced in a cell-free expression system. *Clin. Vaccine Immunol.* **17**, 784–792 (2010).
314. Swartz, J. Developing cell-free biology for industrial applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 476–485 (2006).
315. Swartz, J. R. Universal cell-free protein synthesis. *Nat. Biotechnol.* **27**, 731–732 (2009).
316. Nand, A., Gautam, A., Pérez, J. B., Merino, A. & Zhu, J. Emerging technology of in situ cell free expression protein microarrays. *Protein Cell* **3**, 84–88 (2012).
317. Nicholls, P. J. *et al.* Characterization of single-chain antibody (sFv)-toxin fusion proteins produced in vitro in rabbit reticulocyte lysate. *J. Biol. Chem.* **268**, 5302–5308 (1993).
318. Erni, B. & Staehelin, T. Initiation of mammalian protein synthesis: dynamic properties of the assembly process in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* **740**, 373–378 (1983).
319. Reynolds, J. E. *et al.* Internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA: the ribosome entry site is at the authentic initiation codon. *RNA* **2**, 867–878 (1996).
320. de Breyne, S., Yu, Y., Unbehauen, A., Pestova, T. V. & Hellen, C. U. T. Direct functional interaction of initiation factor eIF4G with type 1 internal ribosomal entry sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 9197–9202 (2009).
321. Paulous, S., Malnou, C. E., Michel, Y. M., Kean, K. M. & Borman, A. M. Comparison of the capacity of different viral internal ribosome entry segments to direct translation initiation in poly(A)-dependent reticulocyte lysates. *Nucleic Acids Res.* **31**, 722–733 (2003).
322. Steen, H. & Mann, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 699–711 (2004).

323. Bantscheff, M., Lemeer, S., Savitski, M. M. & Kuster, B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. *Anal Bioanal Chem* **404**, 939–965 (2012).
324. Ricci, E. P. *et al.* Translation of intronless RNAs is strongly stimulated by the Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2. *Nucleic Acids Res.* **37**, 4932–4943 (2009).
325. Fontaine-Rodriguez, E. C., Taylor, T. J., Olesky, M. & Knipe, D. M. Proteomics of herpes simplex virus infected cell protein 27: association with translation initiation factors. *Virology* **330**, 487–492 (2004).
326. Dobrikova, E., Shveygert, M., Walters, R. & Gromeier, M. Herpes simplex virus proteins ICP27 and UL47 associate with polyadenylate-binding protein and control its subcellular distribution. *J. Virol.* **84**, 270–279 (2010).
327. Boyne, J. R., Jackson, B. R., Taylor, A., Macnab, S. A. & Whitehouse, A. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57 protein interacts with PYM to enhance translation of viral intronless mRNAs. *EMBO J.* **29**, 1851–1864 (2010).
328. Park, H. S., Himmelbach, A., Browning, K. S., Hohn, T. & Ryabova, L. A. A plant viral 'reinitiation' factor interacts with the host translational machinery. *Cell* **106**, 723–733 (2001).
329. Twu, K. Y., Noah, D. L., Rao, P., Kuo, R.-L. & Krug, R. M. The CPSF30 binding site on the NS1A protein of influenza A virus is a potential antiviral target. *J. Virol.* **80**, 3957–3965 (2006).

---

# RESUMES

---

## RESUME

Le virus de l'Influenza A est l'agent étiologique des épidémies de grippe saisonnière. Ce virus a développé des stratégies complexes pour exprimer ses protéines dans les cellules hôtes dès 4 heures après infection. Au départ de cette étude, je me suis intéressé aux événements intervenant dans l'initiation de la traduction des ARN messagers viraux. L'infection par le virus de l'Influenza A perturbe profondément la physiologie cellulaire, et notamment les processus d'expression des gènes au niveau des étapes de transcription, maturation et export des ARN messagers. De ce fait, j'ai donc commencé par développer les outils permettant de m'affranchir de ces événements nucléaires pour pouvoir me focaliser sur les mécanismes viraux spécifiques de l'initiation de la traduction.

Ainsi, j'ai conçu et élaboré un nouveau système de traduction *in vitro* qui dérive du lysat de réticulocytes de lapin dans lequel sont ajoutés des ribosomes isolés de cellules en culture. Ce lysat, dit hybride, présente l'avantage d'être très efficace pour la production de protéines tout en conservant les caractéristiques traductionnelles des cellules dont les ribosomes dérivent. Le second volet de mes travaux porte sur le rôle de la protéine virale NS1 au niveau de la traduction cellulaire et virale. En combinant des infections virales avec des expériences *in vitro* et *ex-vivo*, par transfection d'ARN, je montre que NS1 est capable de stimuler la synthèse protéique des ARNm cellulaires et viraux. Par de la mutagenèse dirigée sur cette protéine de 230 acides aminés, j'observe que la région amino-terminale de la protéine (aa 1-81) est responsable de cet effet activateur. Des mutations ponctuelles au sein de ce domaine révèlent l'importance de deux résidus aminés (R38 et K41) dans la stimulation.

En résumé, ces travaux ont permis de mettre au point un nouveau système d'expression *in vitro* et de mieux comprendre comment est contrôlée la synthèse des protéines virales du virus Influenza A.

---

MOTS-CLES: Traduction, traduction *in vitro*, ribosomes, NS1, Influenza, virus



## **Viral subversion of the host translational machinery occurred by Influenza A virus with a new *in vitro* approach**

---

### **ABSTRACT**

Influenza A belongs to the *orthomyxoviridae* family and is the causal agent for the seasonal and epidemic Influenza infections. This virus has developed complex strategies to utilize the host cell protein apparatus for viral protein expression. In this study, I have focused on the events involved during the initiation of translation of viral mRNAs. Influenza A infection profoundly disrupts host cell gene expression mainly at the level of transcription, maturation and mRNA export. As such, it is quite difficult to investigate directly translational control of Influenza.

Therefore, I have started my project by elaborating experimental tools that can be used for this purpose. This was done by designing and developing a new *in vitro* translation system derived from the rabbit reticulocyte lysate which is supplemented with exogenous ribosomes that have been isolated from different cell types. This lysate, called hybrid system, offers the advantage to be very effective in the production of proteins while maintaining the translational characteristics of the cells from which the ribosomes originate. The second part of my work focusses on the role of the viral NS1 protein on cellular and viral translation. By using an experimental approach based on viral infections together with *in vitro* and *ex vivo* translational assays, I could show that NS1 is able to stimulate both viral and cellular protein synthesis. Then, the introduction of deletion mutants of this 230 amino acids protein revealed that its amino-terminal domain (aa 1-81) was responsible for this stimulatory effect (aa 1-81). Finally, the introduction of point mutations in this region showed the importance of two conserved positively charged residues (R38 and K41) for stimulation.

In summary, these studies have yielded a new *in vitro* translation expression system and have shed light on how viral proteins synthesis is regulated by Influenza A virus.

---

**KEY-WORDS:** Translation, *in vitro* translation, ribosomes, NS1, Influenza, virus

DISCIPLINE : VIROLOGIE

---

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

Equipe traduction eucaryote et virale, CIRI, INSERM U1111, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 Allée d'Italie, 69364 Lyon, France

Baptiste Panthu, la thèse effectuée est soutenue par la Région Rhône-Alpes à  
hauteur de 32 116 euros.



## RESUME

Le virus de l'Influenza A est l'agent étiologique des épidémies de grippe saisonnière. Ce virus a développé des stratégies complexes pour exprimer ses protéines dans les cellules hôtes dès 4 heures après infection. Au départ de cette étude, je me suis intéressé aux événements intervenant dans l'initiation de la traduction des ARN messagers viraux. L'infection par le virus de l'Influenza A perturbe profondément la physiologie cellulaire, et notamment les processus d'expression des gènes au niveau des étapes de transcription, maturation et export des ARN messagers. De ce fait, j'ai donc commencé par développer les outils permettant de m'affranchir de ces événements nucléaires pour pouvoir me focaliser sur les mécanismes viraux spécifiques de l'initiation de la traduction.

Ainsi, j'ai conçu et élaboré un nouveau système de traduction *in vitro* qui dérive du lysat de réticulocytes de lapin dans lequel sont ajoutés des ribosomes isolés de cellules en culture. Ce lysat, dit hybride, présente l'avantage d'être très efficace pour la production de protéines tout en conservant les caractéristiques traductionnelles des cellules dont les ribosomes dérivent. Le second volet de mes travaux porte sur le rôle de la protéine virale NS1 au niveau de la traduction cellulaire et virale. En combinant des infections virales avec des expériences *in vitro* et *ex-vivo*, par transfection d'ARN, je montre que NS1 est capable de stimuler la synthèse protéique des ARNm cellulaires et viraux. Par de la mutagenèse dirigée sur cette protéine de 230 acides aminés, j'observe que la région amino-terminale de la protéine (aa 1-81) est responsable de cet effet activateur. Des mutations ponctuelles au sein de ce domaine révèlent l'importance de deux résidus aminés (R38 et K41) dans la stimulation.

En résumé, ces travaux ont permis de mettre au point un nouveau système d'expression *in vitro* et de mieux comprendre comment est contrôlée la synthèse des protéines virales du virus Influenza A.

---

MOTS-CLES: Traduction, traduction *in vitro*, ribosomes, NS1, Influenza, virus